

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2016

Ing. Miloš Dvořák



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘENOSITELNÉ A MINIATURIZOVANÉ SEPARAČNÍ
TECHNIKY VYUŽITELNÉ PRO POTRAVINÁŘSKÉ A
BIOTECHNOLOGICKÉ ANALÝZY**

PORTABLE AND MINIATURIZED SEPARATION TECHNIQUES APPLICABLE FOR FOOD AND
BIOTECHNOLOGY ANALYSIS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Miloš Dvořák

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

BRNO 2016

ABSTRAKT

K analýze biologicky aktivních látek v přírodních materiálech se používá řada separačních metod. K separaci nabitých částic byla s úspěchem použita kapilární elektroforéza. Uvedená technika byla v této práci použita při stanovení 6 frakcí kaseinů, ve 144 vzorcích, pocházejících z pokusu vlivu výživy na produkci kaseinů. Poprvé byly separovány tyto frakce s úplným rozlišením všech frakcí. Kapilární elektroforéza byla aplikována také při stanovení krátkořetězcových organických kyselin v průběhu kvašení vinného moštu, pro určení profilu změn těchto kyselin a porovnání vlivu rozdílných kvasinek na zastoupení těchto kyselin v moštech. Analýzy neprokázaly rozdíl ve změně organických kyselin, pouze rychlost odbourání kyseliny jablečné se lišila. Byl vyvinut přenosný miniaturizovaný systém pro kapalinovou chromatografii. Byly testovány jednotlivé komponenty a systém byl použit při izokratické i gradientové eluci různých analytů (potravinová barviva, parabeny). Byly charakterizovány nové řady elektroluminiscenčních diod (LED), založené na odlišném materiálovém substrátu a porovnávány se starší řadou diod. Byly charakterizovány detekční systémy s použitím těchto zdrojů a jejich použití demonstrováno při detekci analytů v průtokové vstřikovací analýze a chromatografické separaci. Poprvé tak byly charakterizovány tyto zdroje a byl osvětlen původ parazitního emisního pásu vyskytující se u LED zdrojů v oblasti kolem 255 nm. Tento původ byl dán poruchami materiálového substrátu. Předložená práce přináší poznatky týkající se levných, přenositelných systémů a detekčních zařízení z oblasti analytické chemie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Separace, kapilární zónová elektroforéza, kaseiny, organické kyseliny, přenosné a miniaturizované systémy, kapalinová chromatografie, elektroluminiscenční diody (LED), charakterizace přenositelných a detekčních systémů

ABSTRACT

Capillary electrophoresis was used for determination of 6 fractions of caseins. Those fractions were measured in 144 samples of cow's milk originated from the feeding experiment focused on explanation the influence of the feeding onto casein productions. In this work were separated 6 fraction of caseins first time with total resolution of the peaks.

Capillary electrophoresis was applied for determination of short-chain organic acids during fermentation of wine must. It was compared the fermentation of must fermented by different yeast. The difference of profile short-chain organic acids during fermentation were not statistically significant. The once difference was in the utilisation of the malic acid and production of the lactic acid.

A portable miniaturized system for medium pressure liquid chromatography was developed. The components were tested and system was used for the isocratic and gradient elution of various analytes (food dyes, parabens).

New line of electroluminescent diodes (LEDs) for deep-UV areas of wavelength based on a different materials substrate was characterised. The new line was compared with old line LEDs. The new line LEDs was incorporated in deep-UV absorbance detectors. Detectors were characterised and tested for a detection various analytes in modes flow injection analysis and chromatography separation. First time was characterised this new line of the LEDs and the origin of the parasitic emission band produced by deep-UV LEDs light sources was explained. This origin is given by disturbances of a materials substrates.

This work is a contribution for an advance of low-cost and portable systems and detection devices in the field of analytical chemistry.

KEYWORDS

Separation, capillary zone electrophoresis, caseins, organic acid, portable and miniaturized instrumentation, liquid chromatography, electroluminescent diodes (LED), characterisation of portable and detection system

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis doktoranda

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi jakoukoli měrou nebránili v rozvoji mé vědecké kariéry, tvorbě této práce i osobního poznání samotného po dobu mého působení v doktorandském studiu na Fakultě chemické VUT. Děkuji především svým vedoucím RNDr. Mileně Vespalcové, PhD. a doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za umožnění volné pole působnosti, přívětivé poradě revizi této práce a podporu. Velkou měrou děkuji za vstřícné vedení a umožnění rozvoje poznání z oblasti nekonvenčních přístupů k vědecké práci v oblasti analýz plynů a přístrojových znalostí RNDr. Hannielovi Dubskému, CSc.. Za urychlení mého vědeckého vývoje, pečlivé vedení v orientaci na vědeckém poli světového měřítka děkuji za umožnění dlouhé zahraniční stáže profesorovi Mirkovi Mackovi a Australskému centru pro separační vědy (ACROSS) v australské Tasmánii, včetně dobrých zahraničních kolegů, kteří mne přijali a poskytnutí přívětivého prostředí pro práci i život, což mělo vliv na mé další působení. Z této oblasti patří dík i Ing. Petrovi Smejkalovi, PhD., který mi pomáhal v životě na University of Tasmania projít, kromě vědeckých oblastí, i osobními zkouškami v posunu fyzických a psychických hranic v průběhu průzkumů jeskynních systémů, což odráží svět bloudění vědou. Své rodině, zejména otci Lubomírovi a matce Marii, i dalším z blízkého okruhu, kteří mi poskytli čas a nevyčerpatelnou podporu pro nároky kladené vědeckou a akademickou prací i životem patří velký dík. Na závěr patří poděkování za utváření psychické pohody, radosti, pomoci, rozbřesky i návraty do reality a střízlivění mým nejbližším kamarádům, známým a kolegům, které jsem potkal a poznal v průběhu mého působení na fakultě a VUT v Brně a kteří se stali stálou kostrou mých nejstálejších bližších přátel za poslední roky, kteří mne do větší či menší míry dokázali pochopit, nebo alespoň akceptovat a respektovat. Děkuji i za možnost poznání a otevření obzorů zcela jiné roviny a možností ostatním blízkým přátelům, kamarádům a známým, které jsem potkal díky působení v akademicko-vědecké oblasti v Brně ať už dvounohým, i jejich věrným čtyřnohým průvodcům, pro zkušenost a potvrzení poznání, že nic není nemožné, stačí jen chtít, zkoušet to a jít. Dík i těm kterým to patří a nebyli jmenováni, nebo naznačeni. Poděkování bych zakončil svými dvěma oblíbenými autorskými citáty platících ve vědecké i nevědecké dimenzi.

„Všechno je o náboji. Spravedlnost na světě není, ale rovnováha je vždy zachována.“

Miloš Dvořák

Obsah

OBSAH.....	4
1 ÚVOD.....	6
2 PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
2.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU KASEINOVÝCH FRAKČÍ	7
2.1.1 Význam a postavení kaseinových frakcí	7
2.1.2 Vlivy na zastoupení kaseinových frakcí	10
2.1.3 Vliv výživy na zastoupení kaseinových frakcí	12
2.1.4 Stanovení kaseinových frakcí kapilární elektroforézou	13
2.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	16
2.2.1 Postavení organických kyselin a mikroflóry v procesu výroby vína	17
2.2.2 Separace organických kyselin s krátkým řetězcem elektromigračními technikami	21
2.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	24
2.4 ELEKTROLUMINISČENČNÍ ZDROJE HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI	27
2.4.1 Použití LED zdrojů pro hlubokou UV oblast v potravinářství a analytické instrumentaci	28
2.4.2 Současný stav a trendy LED zdrojů pro hlubokou UV oblast	30
3 CÍLE PRÁCE.....	32
3.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PŘI ANALÝZE KASEINOVÝCH FRAKČÍ A V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	32
3.2 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	32
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU KASEINŮ	33
4.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	36
4.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	38
4.4 POUŽITÍ K ELEKTROLUMINISČENČNÍM ZDROJŮM (LED) HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI NA PŘENOSNÝCH SYSTÉMECH	38
5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	46
5.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PŘI ANALÝZE KASEINOVÝCH FRAKČÍ	46
5.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	47
5.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	53
5.4 ELEKTROLUMINISČENČNÍ ZDROJE HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI	62
6 ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ A BUDOUCÍ VÝZKUMNÉ SMĚRY	74
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	76
8 SEZNAM CITOVANÝCH LITERÁRNÍCH PRAMENŮ	77
9 ŽIVOTOPIS AUTORA	100

10	PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA.....	105
11	PLNÉ ZNĚNÍ (XEROKOPIE) VYBRANÝCH PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ.....	110
11.1	VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU KASEINOVÝCH FRAKcí	110
11.2	VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	111
11.3	PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM.....	114
11.4	PŘÍSPĚVEK K ELEKTROLUMINESCENČNÍM ZDROJŮM HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI.....	125

1 ÚVOD

Přenositelnost, zmenšování rozměrů zařízení a minimalizace spotřeby chemikálií a vzorků je jedním z významných směrů analytické chemie. S rozvojem tohoto směru je čím dál více umožňován přesun analytické instrumentace z laboratoří přímo do místa odběru vzorků a v ideálním případě je instrumentace začleněna přímo do kroku (bio)technologické výroby. Žádoucí je i automatizace vzorkování a propojení „on-line“ analýz v reálném čase, bez nutnosti transportovat vzorek do laboratoří. Limitující je často komerční (ne)dostupnost jednotlivých komponent. V případě jejich nedostupnosti sice je možné je sestavovat v laboratorních podmínkách, ale je to prakticky neopakovatelné dalšími osobami a vše je vázáno na zručnost a znalosti často i jednoho výzkumníka. Proto je cesta hledání možností miniaturizace a přenositelných částí a jejich kombinace stále cestou, tak jak jde vývoj, aktuální i pro vědecké pole. Jednou z nejjednodušších separačních technik, která je nejdále v oblasti miniaturizace se stala kapilární elektroforéza. Ta vyniká instrumentální jednoduchostí a nenáročností na spotřebu vzorků a chemikálií. Proto ji i v případě užití komerční stolní instrumentace lze řadit mezi nízkonákladové techniky.

Kapilární elektroforéza se používá v potravinářském a biotechnologickém odvětví s cílem v budoucnu tuto techniku začleňovat přímo do provozu. Nachází uplatnění např. při stanovení kaseinů, které jsou významnou složkou mlékárenského a sýrařského průmyslu, při sledování procesu fermentace vinného moštu, zrání vína, a složení výsledného produktu.

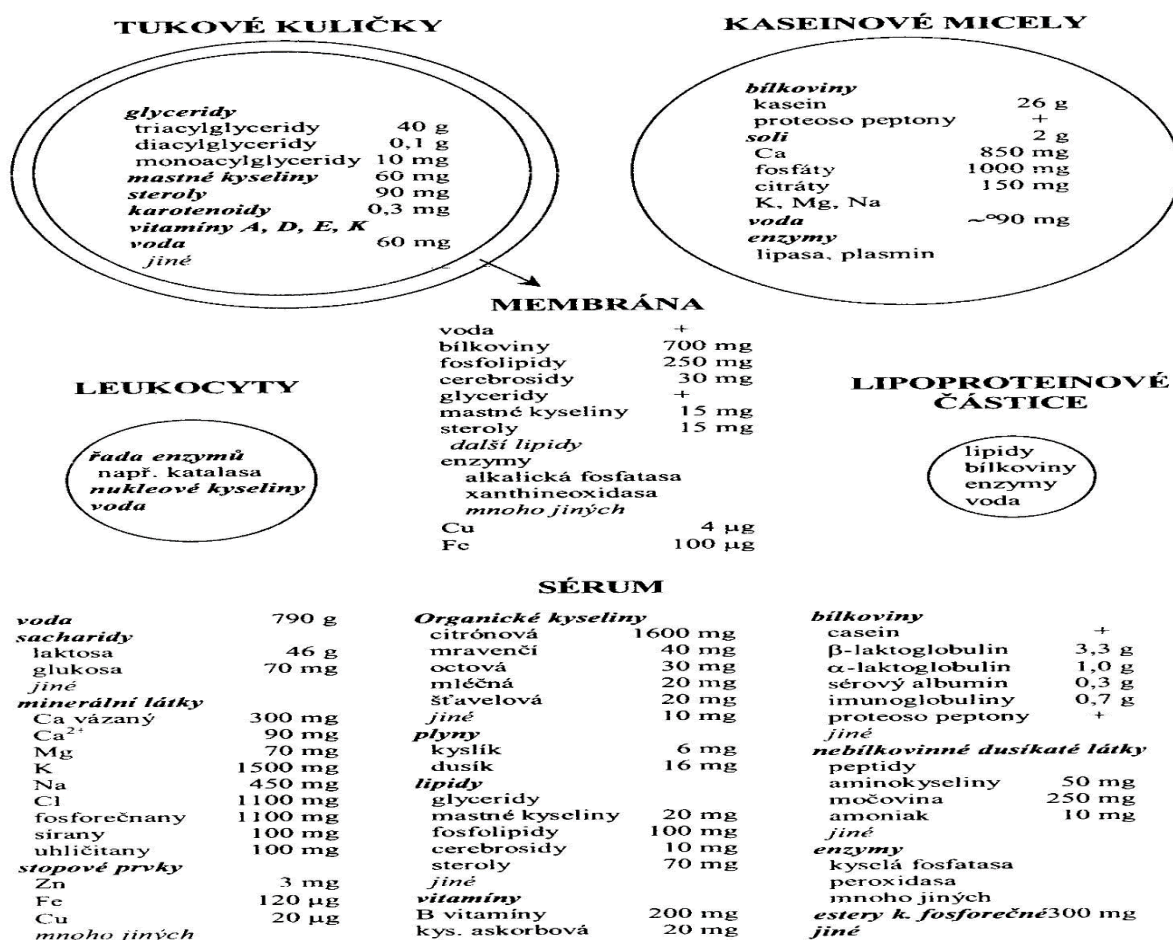
2 PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu kaseinových frakcí

2.1.1 Význam a postavení kaseinových frakcí

Mléko je sekreční produkt mléčných žláz savců sloužící jako základní zdroj výživy mláďat. Jedná se o homogenní, polydisperzní kapalinu, jejíž složení a vlastnosti jsou značně proměnné v závislosti na původu mléka. Výrazně závisí na odlišnosti jedinců, regionalitě jejich výskytu, ročním období a podmínkách skladování mléka. Mléko obsahuje značné množství bílkovin, dle kterých se také někdy rozděluje do skupin. Kobydí, velbloudí a oslí mléka jsou označována jako albuminová, kravská, kozí, ovčí a buvolí jako mléka kaseinová. Polydisperzní systém mléka se skládá z několika fází – emulzní, obsahující tuky, koloidní, zahrnující bílkoviny a molekulové, do níž spadají laktóza a minerální soli. Hustota mléka je průměrně $1,03 \text{ g.cm}^{-3}$ a pH se pohybuje v rozmezí hodnot 6,5–6,7 [1] a [2].

V dalším textu, pokud nebude uvedeno jinak, bude vše vztaženo ke kravskému mléku. To obsahuje v průměru 4 % tuku, 3,2 % bílkovin – z nich 2,6 % kaseinových a 0,6 % sérových, neboli syrovátkových, 4,6 % laktózy, a 0,7 % popelovin. Zbytek tvoří z asi 87 % voda. Zejména hodnoty obsahu tuků jsou však značně variabilní. Odchytky u mléčných bílkovin a popelovin nepřesahují několik desetin procent. Mléčný tuk se vyskytuje ve formě emulze v mléčné plazmě. Převažující složka mléka – mléčné bílkoviny, jsou zastoupeny v séru ve formě koloidní disperze. Vedle nich je přítomen pravý roztok laktózy, minerálních látek a dalších složek [3]. Náhled na komplexnost a distribuci složek v mléce znázorňuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Složení a struktura kravského mléka, přibližné průměrné hodnoty v 1 kg mléka [1]

Dusíkaté látky jsou nejdůležitější součástí mléka. Určují jeho základní fyzikální a chemické vlastnosti a jsou důležité z nutričního hlediska. Některé mají i významné biologické funkce. Obsah bílkovin se podílí také na ekonomice mlékárenství. Dle jejich obsahu je mléko propláceno. Celkové dusíkaté látky jsou označovány jako „hrubá bílkovina“. Z nich asi 5 až 7 % tvoří dusíkaté látky nebílkovinného charakteru, kterými jsou močovina, amoniak, kreatin a další. Odečtením těchto látek od hrubé bílkoviny se získá „čistá bílkovina“. Z jejího celkového množství v mléce tvoří zhruba z 80 % procent kaseiny a zbytek jsou sérové proteiny. Kaseiny tvoří komplex frakcí, fosfoproteinů. Je známa jejich aminokyselinová skladba a struktura. Základní frakce kaseinů jsou označovány jako α_s , β a κ . Ostatní frakce se považují za jejich deriváty. Kaseinové frakce jsou v kravském mléce zastoupeny v následujícím poměru: α_s 42 %, β 25 % a κ 9 %. Zbytek do 80 % kaseinových bílkovin v mléce, asi 4 %, tvoří degradační produkty β -kaseinu. Kromě frakce κ jsou všechny vysoce citlivé na přítomnost vápníku v mléce. Právě proti vysrážení je chrání přítomnost κ -kaseinu [4].

Interakce s vápenatými ionty je významná pro strukturu kaseinů v mléce. Kaseiny jsou přítomny ve formě koloidní disperze a vlivem hydrofobních sil se seskupují do submicel o velikosti 12 – 15 nm a ty dále agregují za účasti fosforečnanů a citrátu vápenatého do micel velkých 50 – 300 nm. Na povrchu micel se vyskytuje κ -kasein, necitlivý na vápenaté ionty a zabraňuje tak shlukování kaseinových micel vápníkovými můstky. Stabilita kaseinových micel je ovlivňována zejména kyselostí prostředí, teplotou, proteolýzou (hydrolýzou κ -kaseinu) a aktivitou vápenatých iontů. Zejména zvýšenou teplotou dochází ke zvětšování micel a ztrátě jejich stability a při kyselejších pH (kolem 4,6) dochází ke snížení negativního náboje a ztrátě odpuzivých sil. Oba jevy vedou k vysrážení kaseinů. Při hydrolýze κ -kaseinu dochází mezi micelami ke spojování vápníkovými můstky a vytváření gelu. Tento proces se nazývá sladké srážení mléka. Kombinace snížení pH na izoelektrický bod 4,6 pomocí kyseliny a zahřátí na teplotu 35 – 50°C se využívá v mlékárenském průmyslu jako kyselé srážení při výrobě sýrů. Vzniká tzv. kyselý kasein. Obdobu tohoto postupu se využívá při zpracování vzorků mléka pro získání kaseinových frakcí [5]. Kaseinové micely lze také rozrušit enzymaticky. Působením enzymu chymosinu dojde k rozštěpení κ -kaseinu, micely tak ztratí ochranný obal a frakce kaseinů se vysráží ve formě vápenatých solí [6].

Hlavní složkou kaseinové frakce jsou α_s -kaseiny. Jsou to fosfoproteiny a v kravském mléce se vyskytují jako α_{s1} a α_{s2} modifikace, oba ve čtyřech genetických variantách označovaných A, B, C a D, lišících se primární strukturou. Nejobvyklejší je varianta B. Kaseiny α_{s1} obsahují ve variantě B polypeptidové řetězce složené ze 199 aminokyselin. Jejich molekulová hmotnost je 23,6 kDa a oblast pI mají při pH 4,92 – 5,35. Za polárnost této molekuly mohou fosfoserinové zbytky. Fragmenty α_{s1} -kaseinů se označují jako λ -kaseiny. Kaseiny α_{s2} mají obdobnou strukturu, jejich molekulová hmotnost je 25,2 kDa, ale jsou méně citlivé na přítomnost vápenatých iontů než varianta α_{s1} . Řetězce β -kaseinů se skládají z 209 zbytků aminokyselin a jejich molekulová hmotnost je 24 kDa. Izoelektrický bod mají v oblasti pH 5,20 – 5,85. Stejně jako α_s -kaseiny mají fosfoserinové zbytky. Vyskytují se v 7 genetických variantách. Produkty degradace β -kaseinů jsou označovány jako γ -kaseiny. Ve dvou genetických variantách se v kravském mléce vyskytuje κ -kasein. Jeho běžnější varianta B se skládá ze 169 aminokyselinových zbytků a jeho hmotnost je 18 kDa. Izoelektrický bod má při 5,37. V molekulách κ -kaseinů jsou přítomny sacharidy, zejména tetrasacharid, vázané na protein glykosidovou vazbou. S vápenatými ionty tvoří rozpustné soli, jež stabilizují α_s - a β -kaseiny v mléce. Jeho enzymatickým štěpením se získá para- κ -kasein

a κ -kaseinmakropeptid. Typická micela kravského mléka obsahuje asi 20 000 molekul kaseinů. Micelu tvoří zhruba z 93 % kaseiny, 3 % vápenaté ionty, 3 % anorganický fosfát, někdy označován jako volný, 2 % fosfát ve formě fosfoserinu, 0,1 % citrát a 0,5 % ostatní minerální ionty, jako jsou Na, K a Mg. V mléce se vyskytuje zhruba $1 \cdot 10^{12}$ micel v jednom ml. Na povrchu micel jsou elektrostaticky vázány soli koloidního fosfátu vápenatého a molekuly vody [7].

2.1.2 Vlivy na zastoupení kaseinových frakcí

Obecně obsah dusíkatých látek kolísá v závislosti na řadě faktorů, kterými jsou výživa plemeno, dojivost, sezóna, stádium laktace a podobně. Zejména vliv výživy se projevuje na celkové produkci bílkovin i na zastoupení jednotlivých složek mléka. Složení a vlastnosti mléka ovlivňuje význačným způsobem i plemenná příslušnost. Mezi různými plemeny byly zjištěny značné rozdíly v zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin v závislosti na genetické příslušnosti. Jelikož genetické varianty bílkovin se liší aminokyselinovým složením, jsou tak rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti mléka od různých plemen. To má zásadní význam na technologické zpracování mléka z hlediska termostability a syřitelnosti. Zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin je dáno především geneticky a nelze je významně ovlivňovat [8]. Vlivem ostatních faktorů mohou nastat změny v obsahu jednotlivých dusíkatých látek, což může ovlivnit technologické vlastnosti mléka více než genetická variabilita skotu. Na technologických vlastnostech mléka se nejvíce projevuje právě změna zastoupení frakcí kaseinů a syrovátkových bílkovin, které mají zásadní vliv na kvasnost a syřitelnost mléka [9].

Dalším významným faktorem, ovlivňující zejména zastoupení bílkovinných frakcí, je zdravotní stav dojnic [4].

Jaké typy kaseinů bude mléko obsahovat, závisí z největší části na tom, jaké formy genetických alel jsou obsaženy v genetickém materiálu dojnic [10].

Ekonomicky a chovatelsky nejvýhodnější je dojnice s alelami, neboli genotypem, BB, horší výtěžnost sýra z mléka mají dojnice nesoucí alelu A. Nejhorší je alela E – mléko od dojnic s genotypem EE není vůbec možné srážet. Genetická varianta κ -kaseinu BB má velký ekonomický význam pro výrobu sýra [11]. U skotu holštýnského typu v České republice se odhaduje frekvence zastoupení alel A 66 %, B 25 % a E 9 % [12].

Skot lze nechat geneticky otestovat na přítomnost vhodné alely. Zejména při šlechtění a rozmnožování má smysl testování genotypu, aby byly zastoupeny alely žádoucí

pro tvorbu kaseinů typově vhodného ke srážení a tvorbě sýrů. Místo genetických testů, lze otestovat i samotné mléko na složení kaseinových frakcí a určení vhodnosti mléka k technologickému zpracování a tím nepřímo určit genetickou vhodnost pro šlechtění [13] a [14].

Nežádoucím aspektem kaseinů je jejich možná alergenita. Hlavní alergeny kravského mléka přímo nejsou známy, ale za hlavní látky vyvolávající alergii je z kaseinů označován α_s -kasein. Různou citlivost k bílkovinám však ovlivňuje poměr mezi kaseinovým a syrovátkovým složením [15].

Kromě výroby sýrů lze kaseiny, v podobě kaseinátů, použít i jako technologické modifikátory, to jest zahušťovadla, bělidla apod. pro masný, pekárenský a jiný průmysl. V souvislosti s jejich možnou alergenitou je jejich přidávané množství sledováno např. Evropským nařízením 760/2008/ES, ve znění pozdějších předpisů. Hranice přídatků kaseinátů se pohybuje dle potravin do výše 10 % [16].

Z předchozích poznatků lze shrnout, že stanovení frakcí kaseinů je požadováno z několika důvodů. V zemědělsko-technologických účelech skladba a množství frakcí může identifikovat původ mléka v závislosti na plemenné různorodosti skotu. Dále slouží k odhalení falšování míšení mlék různých původů. Určuje i jeho vhodnost pro následné zpracování mléka zejména pro sýrařské účely, např. i proteolýzu kaseinů. Kromě toho se kaseiny podílejí významně na tvorbě ceny mléka při výkupu pro jeho další zpracování. Stanovení obsahu jednotlivých kaseinových modifikací i celkového množství kaseinů při prvovýrobě umožňuje sledování skladby frakcí v závislosti na výživě, o čemž pojednává samostatná kapitola. Změna skladby frakcí může sloužit i k odhalení nemoci nebo poruch skotu [17] a [18]. Analýzy kaseinových frakcí, se dají využít i ze zdravotního hlediska ke zjištění výskytu potenciálně alergenních složek. Využití metody stanovování kaseinů je vymíněno i legislativními požadavky, pro sledování jejich přidávání do dalších potravin. Všechny tyto požadavky vedou k vývoji co nejjednodušší a nejlevnější, ale zároveň efektivní metody pro analýzy kaseinů. Uvedené požadavky splňuje technika kapilární elektroforézy, pomocí níž lze separace proteinů úspěšně provádět [19] a [20]. 2 roky zpět byla publikována práce zabírající se diagnostikou mléčných proteinových alergenů pomocí imunoafinitních elektroforetických metod spojených s hmotností spektrometrií [21].

2.1.3 Vliv výživy na zastoupení kaseinových frakcí

Nenutriční faktory

Mezi nenutriční faktory ovlivňující složení mléka patří vliv genetické predispozice skotu. Ten lze velkou měrou ovlivnit šlechtitelsky. V případě použití tradičních šlechtitelských technik se výsledek projeví až po mnoha letech. Další faktor je roční období. Zejména obsah tuku a bílkovin se zvyšuje v zimních měsících a nejnižší bývá v létě. Dáno je to zejména typem dostupné stravy, takže tento faktor je na pomezí nutričních a nenutričních vlivů. Složení mléka se mění i se stádiem laktace, kdy mléko je obsahuje největší koncentrace složek v časně a pak pozdní fázi. Ke změnám dochází i se zvyšováním věku dojnic. S rostoucím věkem se redukuje obsah bílkovin v mléce, obsah tuků se výrazně nemění. Poslední nenutriční faktor může být onemocnění vemene, například zánětem (mastitidou). Při ní se snižuje obsah tuků a kaseinů, ale vzrůstá počet sérových proteinů [22], [4] a [23].

Nutriční faktory

Nejrychlejší změny složení mléka se dosahují složením výživy. Dají se tak ovlivnit téměř všechny složky mléka. Požadované živiny obsažené v krmivu jsou absorbovány a transportovány do mléčných žláz, odkud jsou vylučovány do mléka [24].

Nejvíce stravou ovlivnitelná složka je mléčný tuk. Jeho množství se může měnit až o 3 %. Proteiny se mění v rozmezí kolem 0,3 %. Nejméně se mění obsah laktózy. Změny složení složek mléka v závislosti na stravě nebývají vždy zřetelné a nejsou úměrné množství zkrmované živiny [22] a [25].

Je prokázáno, že příjem bílkovinných látek ve stravě ovlivňuje jak výtěžek mléka, tak i tak i jejich procento v mléce. Změny výživy ovlivňují výtěžnost mléka, ale mají často opačný vliv na koncentraci proteinů. Záměrem úpravy krmiv je zvyšování obsahu proteinových složek, při stejné nebo vyšší výtěžnosti mléka [26] a [27]. Pro maximální výtěžnost mléčných bílkovin je nutné maximalizovat produkci proteinů z mikrobiální činnosti v tenkém střevě. Tam vzniká přes 60 % potřebných aminokyselin, které tvoří bílkoviny v mléce. Zvýšení této produkce se dosahuje dobře stravitelnými krmivy, zvýšením příjmu sušiny, v přiměřeném množství poskytnout rozpustné a odbouratelné proteiny a vyvážit bachorový poměr dostupné sacharidy a proteiny [23]. Při syntézách mléka se uplatňuje i neodbouratelný protein. To je část bílkovin přijatých krmivem, které bez odbourání v bachoru pokračují do tenkého střeva. Dle krmiva

kolísá množství neodbouratelného proteinu. Dohromady mikrobiální a neodbouratelný protein tvoří využitelný protein pro zásobení dojnice potřebnými bílkovinami. Z krmiva asi 75–80 % tvoří mikrobiální protein a neodbouratelný protein představuje asi 20–30 %. Při nadbytku neodbouratelných proteinů je zvýšené riziko poklesu tvorby mléčných bílkovin. Nadbytek bílkovin ve stravě může způsobit zdravotní komplikace, je tedy lépe ovlivňovat složení krmiva [26].

Pro podporu výtěžku mléka a koncentraci mléčných bílkovin, řada studií popisuje zásobení mléčných žláz zvýšeným množstvím aminokyselin, případně změna jejich profilu. Preference je kladena na vyšší obsah esenciálních a limitujících aminokyselin [27].

V syntéze bílkovin má podstatný význam energetická složka krmiva. Nedostatek energie způsobí pokles výtěžku mléka i obsah mléčných bílkovin. Zvýšením energie krmné směsi se může dosáhnout i větší koncentrace mléčných bílkovin. Vhodným zdrojem energie je pomocí sacharidů, zejména vlákniny a škrobu (např. z obilných zrn), a látek schopných zvýšit hladinu krevního cukru. Stupeň uvolněné energie závisí na způsobu zpracování matrice bachorem. Vyšší obsah škrobu ve směsi zvyšuje koncentraci bílkovin a snižuje obsah mléčného tuku v mléce [28].

2.1.4 Stanovení kaseinových frakcí kapilární elektroforézou

V roce 1993 byla užita kapilární elektroforéza k separaci kaseinových frakcí v křemenné pokryté kapiláře, která byla hydrofilně pokryta složkami základního elektrolytu. Kapilára měla celkovou délku 57 cm a vnitřní průměr 50 μm . Analýza probíhala při 45°C, testováno separační napětí 20 a 25 kV. Detekce probíhala při 214 nm. Základní elektrolyt byl testován 10mM fosfátový a 10mM citrátový pufr o pH 2,5–3 s obsahem 6M močoviny a methylhydroxyethylcelulosity (MHEC). To zabraňovalo adsorpci proteinů na povrch kapiláry. Kaseinové micely byly rozrušeny dithiothreitem (DTT) přidaným do redukčního pufru pro rozpouštění vzorku. Jejich opětovné tvorbě při separaci bránila přítomná močovina. Účinnost dosahovala 300 000 až 700 000 teoretických pater. Doba separace byla do 30 minut s dobrým rozlišením dvou α_s frakcí, jedné κ frakce a dvou β frakcí [29].

Validace kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinu v ovčím mléce byla publikována v roce 1999. Separace probíhala v hydrofobně pokryté křemenné kapiláře o délce

50 cm o vnitřním průměru 50 μm . Separační napětí bylo 25 kV, proud 30 μA a teplota 40°C. Detekce probíhala při 214 nm. Separovány byly dvě α_s frakce kaseinů a dvě β frakce. Analýza trvala do 35 minut. Všechny analyty byly od sebe úplně rozlišeny [30]. Metoda byla v roce 2000 aplikována na studování sýření ovčího sýra [31].

Metoda souběžného stanovení syrovátkových proteinů, kaseinů a para kaseinu v mléce a mléčných produktech byla publikována v roce 2001 [32]. Separace probíhala v hydrofilně pokryté křemenné kapiláře o 60 cm celkové a 50 cm efektivní délce, vnitřního průměru 50 μm . Separační napětí 25 kV a detekce při 214 nm. Vedle dalších proteinů byly plně rozlišeny dvě α_s , jedna κ a tři β frakce kaseinů.

V roce 2003 byla publikována studie podmínek separace kaseinů kravského mléka [33]. Byla užita křemenná kapilára o 57 cm celkové a 50 cm efektivní délce, vnitřního průměru 50 μm . Detekce probíhala při 214 nm. Separace probíhala při napětí 18,5 kV a teplotě 23°C. Vzorky mléka byly rozpuštěny v pufru o pH 8 s obsahem 8M močoviny a 10mM DTT. Základní elektrolyt byl tvořen 50mM fosfátovým pufrem s obsahem 6M močoviny a 0,05 % HPMC, nastaven na pH 3. Separovány byly dvě α_s , tři β a jedna κ frakce kaseinů, s neúplným rozlišením. Linearita byla stanovena v oblasti od 2 do 10 mg/l. Analýza probíhala méně než 40 minut.

V roce 2006 byla publikována studie na porovnání stanovení frakcí kaseinů pomocí kapilární elektroforézy a izoelektrické fokusace. Pro kapilární elektroforézu použity obdobné podmínky jako v předchozích případech, to jest citrátový pufr, pH kolem 3 s přidavkem aditiv a roztokem močoviny. Separovány byly α_s a β frakce. Rozlišení analytů bylo úplné. Obě metody byly shledány porovnatelně účinné [34].

O rok později byla použita kapilární zónová elektroforéza pro separaci lidských mléčných proteinů. Použita byla křemenná kapilára 60 cm celkové a 50 cm efektivní délky, vnitřního průměru 50 μm . Separace probíhaly při 45°C, napětí 30 kV, detekci při 214 nm. Vzorek byl rozpuštěn v pufru obsahující 42mM morfolino-propansulfonovou kyselinu, 167mM Tris, 67mM EDTA, 17mM DTT, 10mM močovinu a 0,083 % MHEC. Základní elektrolyt obsahoval 0,19M kyselinu citrónovou a 20mM citrát sodný v 6M močovíně, obsahující 0,05 % MHEC. pH bylo upraveno na 2,3. Analýza trvala 40 min. Separovány byly skupiny α_s - a β -kaseinů a κ -kasein. Frakce nebyly zcela rozlišeny [35].

Ke studování radiačního efektu na α_s - a β -kaseinové frakce v mléce a sýrech byla kapilární elektroforéza užita v roce 2009. Separace probíhala v křemenné kapiláře o délce

60 cm celkové a efektivní 50 cm, vnitřního průměru 50 μm . Pro separaci bylo užito napětí 25 kV, teplota 20°C a detekce při 214 nm. Pufr pro přípravu vzorků byl složen z 37 mg citrátu trisodného a 38 mg DTT ve 37,5 ml 8M močoviny při pH 8 nastavené NaOH. Základní elektrolyt se skládal z 14,7M kyseliny fosforečné, 0,05 % HPMC a 6M močoviny. Analýza trvala do 40 minut. Identifikovány byly α_s , β i κ frakce s dostatečným rozlišením [36].

V roce 2010 byla publikována studie využívající tyto separační podmínky pro porovnání kaseinového složení korejských kozích mlék s Holštýnským plemenem. S úplným rozlišením byly separovány dvě α_s a κ frakce kaseinů a s neúplně rozlišenými byly některé β frakce. Analýza trvala do 40 minut [37].

V roce 2015 se autoři zaměřili na identifikaci a charakterizaci kaseinových komplexů pomocí gelové elektroforézy [38]. Další variantu elektromigračních metod využili autoři v roce 2010, kdy byly frakce separovány na základě izoelektrického bodu použitím izoelektrické fokusace ve spojení s hmotnostní detekcí [39]. Odraz trendu poslední doby je přenos metody na stanovení kaseinů na mikročipové elektroforetické systémy [40] a [41].

2.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Jedním z velice rozšířených odvětví, potravinářského průmyslu, je oblast vinařství. Sledování procesu fermentace vinného moštu, zrání vína, a složení výsledného produktu je stále aktuálním tématem. Dochází ke zlepšování a zefektivňování instrumentace i samotných metod a získávají se tak nové informace o poznatcích z různých úhlů. Z pohledu analytického zpracování vzorku je víno, mošty a hrozny relativně jednoduchá matrice s poměrně komplexním obsahem látek. Poznatky o složení této matrice mají velký průmyslový význam jak z hlediska rozvoje tohoto odvětví, tak i pro rutinní kontroly procesů.

Víno je homogenní vodný alkoholický roztok řady látek tvořících jeho celkový vjem. Je to produkt kvašení ovocného moštu, kdy se sacharidy přeměňují na alkohol, oxid uhličitý a jako vedlejší produkty metabolismu kvasinek nebo hroznů vznikají další senzoricky významné složky – organické kyseliny, vyšší alkoholy, estery, aldehydy a další. Na konci kvašení víno obsahuje jen zbytkový obsah sacharidů vedle dalších majoritních látek – alkoholu a organických kyselin. U nich nezáleží ani na jejich celkovém obsahu, který se často sleduje jako parametr – celkové titrační kyselosti, ale v jakém zastoupení a poměrech se vyskytují. Dle toho je dán chuťový vjem a vlastnosti vína. Dávají prostor vyniknutí i dalších látek, jelikož prokvašený mošt je komplexní matrice s řadou látek různé povahy, kterými jsou třísloviny, polyfenolické látky, barviva, vyšší alkoholy, minerální látky, aminokyseliny, glycerol a jiné [42].

Kromě senzorického vlivu mají organické kyseliny význam i stabilizační, případně jako ukazatel mikrobiální kontaminace a nežádoucích pochodů. Některé kyseliny, jako vinná a jablečná jsou již obsaženy v moštu a slouží jako substrát pro kvasinky. V průběhu hlavního kvašení a následně při zrání vína, nebo jeho dlouhodobém skladování se v důsledku metabolických procesů skladba kyselin mění a dochází k jejich přeměnám, nebo odbourávání [43].

Krátkořetězcové karboxylové kyseliny, označované běžně termínem organické kyseliny, se vyznačují snadnou ionizovatelností ve vodných roztocích. Jelikož tyto ionizované formy nesou náboj a organické kyseliny se od sebe vyznačují rozdílnou hmotností, lze je výhodně separovat pomocí elektromigračních technik na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. Oproti chromatografickým separačním technikám se elektromigrační techniky pro analýzu organických kyselin vyznačují rychlejšími a lacinějšími

analýzami s nízkou ekologickou náročností na spotřebované chemikálie, což je vhodné zejména pro rutinní analýzy [44].

V oblasti analýzy potravinářských tekutých matric elektromigračními metodami byla publikována řada odborných původních článků shrnutých do přehledové publikace například [45]. V poslední době je pozornost věnována užití elektromigračních metod při sledování biotechnologických procesů jako „on-line“ analýzy v průběhu experimentů [46].

Dizertační práce pojednává o využití analýz nízkouhlíkatých organických kyselin kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Náplní práce je sledování rozdílu zastoupení vybraných organických kyselin v průběhu fermentace vinného moštu utilizovaného různými kvasinkami za podmínek různého agrotechnického ošetření vinohradu. Vliv použité zemědělské techniky se promítá do výsledného organoleptického dojmu a má vliv na biologické a chemické složení výsledného moštu a tím i výsledného produktu vína [47]. Současné vědecké trendy se soustřeďují na miniaturizované a přenositelné techniky. Ty jsou méně robustní, proto je dávana přednost konvenčním analytickým technikám.

Předmětem této práce není analýza fenolických látek, tříslovin a dalších složek hroznů, moštů a vína.

2.2.1 Postavení organických kyselin a mikroflóry v procesu výroby vína

Nízkomolekulární organické kyseliny významně přispívají ke složení, stabilitě a organoleptickým vlastnostem vína, zejména bílého. Mají vliv na pH i barvu vína a hroznů. Jejich ochranný účinek zajišťuje mikrobiální stabilitu vína. Například suchá bílá vína nepodléhající jablečno-mléčnému kvašení jsou více stabilní proti srážení vinanů draselného a vápenatého. Červená vína jsou stabilnější při nižším pH z důvodu přítomnosti polyfenolických sloučenin [48].

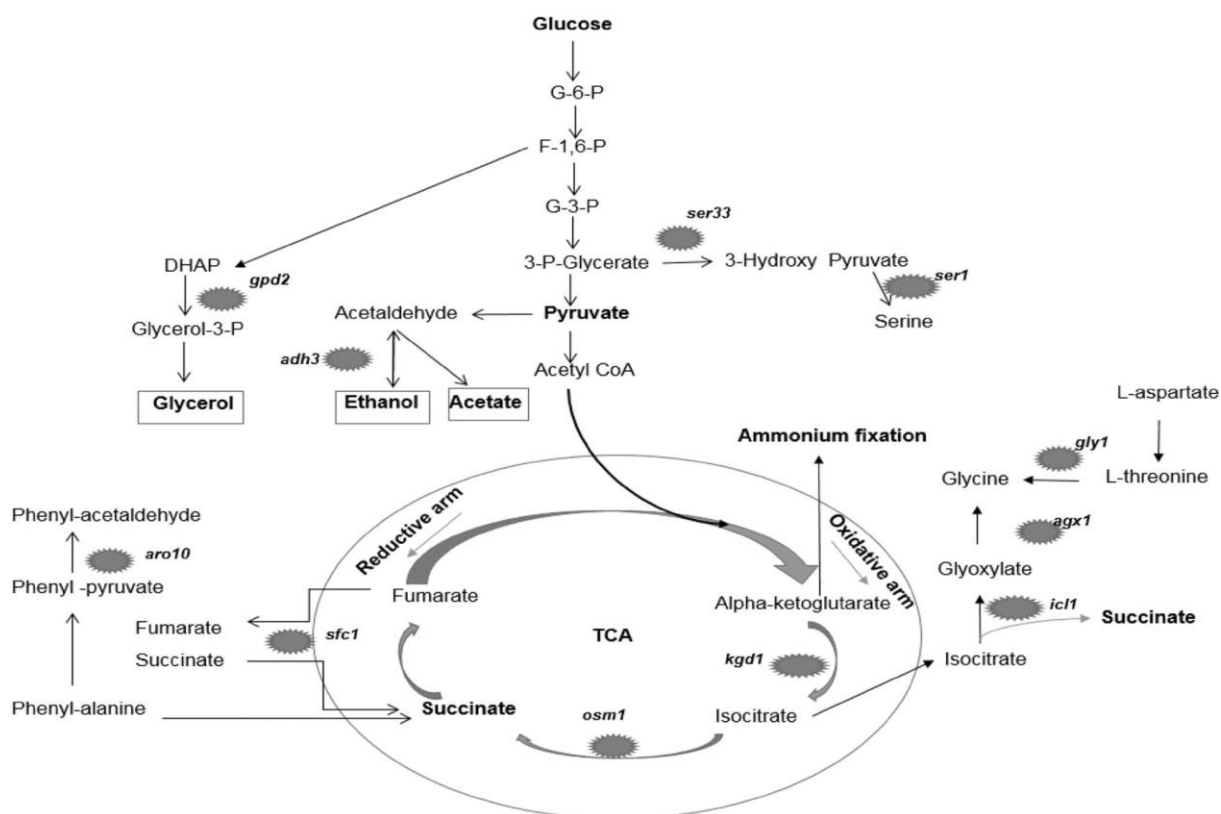
Obecně lze rozdělit původ nízkomolekulárních karboxylových kyselin ve víně a vinném moštu na kyseliny původně vytvořené v hroznech (citronová, jablečná a vinná) a na kyseliny vznikající v průběhu fermentace činností mikroorganismů (jantarová, mléčná a octová) [49]. Při kvašení způsobené kontaminující mikroflórou může vzniknout i kyselina máselná, jež dává nepříjemně žluklou chuť. Kyseliny zastoupené v minoritním množství dokreslují celkový buket vína. Kyselina octová, která je těkavá, přidává vínu octový zápach

a je signálem octovatění vína – mikrobiální kontaminace a známka včasného nezastavení kvasných pochodů [50]. Kyselina citrónová, dává vínu ostrou chuť a její přídavek do vína je zakázán [51].

Koncentrace kyselin v hroznech vzrůstá zejména na začátku růstu hroznových bobulí a s časem zrání hroznů se kyseliny odbourávají a přibývají cukry. Obecně redukce jablečné kyseliny je větší, proto vyzrálé hroznové bobule obsahují více vinné kyseliny než jablečné. Kyselina vinná je v hroznech obsažena jednak jako volná kyselina a jednak jako sůl – dvojjin draselný. Jablečná kyselina je během zrání hroznů odbourávána v důsledku zvětšování hroznů a v důsledku spalování hroznů sluncem. Její množství se mění s obsahem kyseliny vinné [52].

Celková kyselost hroznů může být tak vyšší v chladnějších oblastech. Šťáva z těchto hroznů může při výrobě vyžadovat snížení kyselosti. Většina kyselin z metabolických cyklů, například kyselina pyrohroznová, α -ketoglutarová, fumarová, galakturonová a šikimová se ve vyzrálých hroznech nalézají ve stopových koncentracích. Ve větší míře se nalézají ve vyzrálých hroznech kyselina vinná ($5\text{--}10\text{ g.L}^{-1}$) a jablečná ($1\text{--}15\text{ g.L}^{-1}$). Jejich koncentrace se liší dle původu hroznů ze studenější (vyšší obsah) nebo teplejších oblastí (nižší obsah). Tyto dvě kyseliny jsou syntetizovány v hroznech a rovněž i v listech ale nezdá se, že by byly transportovány do hroznů a jsou součástí zcela odlišných metabolických drah [53].

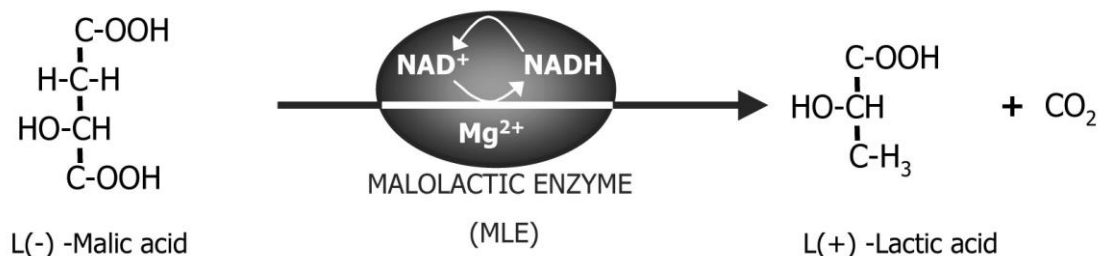
Je známo, že genetická výbava mikroflóry ovlivňuje, jaké složky matrice se budou zpracovávat na jaké výsledné produkty. Taktéž to platí u fermentace vinného moštu, které jsou nejčastěji zpracovávány kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*. Nedávno publikovaná práce [54] popisuje sledování vlivu různých genů na produkci organických kyselin (různé kyseliny, zpracováváné a produkováné v různém množství) a tím i rozdílné organoleptické vlastnosti fermentovaného moštu a vína. Nedávné práce se věnují i vlivu autochtonní kultury na zahájení a průběh fermentace zejména z hlediska kyselin jantarové, pyrohroznové a octové [55] a jiná práce se zabývá sledováním vlivu průmyslových kvasinek [56] z hlediska kyselin vinné, jablečné, citronové, octové, pyrohroznové a jantarové. Obě práce jsou hodnoceny z hlediska genetické morfologie užitých kvasinek. Základní cyklus trikarboxylových kyselin znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Schéma metabolického cyklu trikarboxylových kyselin. Převzato z [54].

Samostatným případem je jablečno-mléčné kvašení (označováno někdy také jako malolaktické, nebo malonové), které probíhá mnohdy spontánně při rozvoji bakterií mléčného kvašení, nebo je užíváno často záměrně zaočkováním těchto mikroorganismů obsahující enzym L-malát:NAD⁺ karboxylyázu (např. bakterie *Oenococcus oeni*). Tato přeměna má organoleptický význam pro zjemnění chuti vína, protože odbouráním kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, se sníží ostrá chuť, za kterou je kyselina jablečná zodpovědná. Tuto transformaci ukazuje Obrázek 3. Vliv jablečno-mléčného kvašení na organoleptický vjem ve vztahu k dalším složkám je řešen např. v práci [57]. Tato fermentace probíhá po hlavním procesu kvašení, kdy ustává činnost kvasinek pro vysoký obsah alkoholu, vyčerpané zásoby cukru a snížené pH. Pokud se víno nezasílí a nezchladí, tak mají možnost se rozvinout bakterie mléčného kvašení [58]. Tyto procesy je třeba v průběhu fermentace také monitorovat a včas zastavit i toto kvašení, protože není dobré nechat odbourat veškerou kyselinu jablečnou pro zachování organoleptického charakteru vína. To vyžaduje rychlé metody stanovení všech zmiňovaných majoritních kyselin, jinak se víno může tzv. zvrhnout a mít cizí příchutě, případně může nastoupit octové kvašení. Rovněž je možné optimalizovat tento druh kvašení volbou kmene mléčných bakterií, případně zvolit podmínky fermentace pro projevení autochtonních

kmenů v moštu se přirozeně vyskytující [59]. Jako další efekt tohoto kvašení je nižší obsah oxidu siřičitého ve finálním produktu. Tato operace však vyžaduje řízení a sledování obsahu všech kyselin, protože snadno může dojít k nežádoucím pochodům a při včasném nezastavení reakce může víno začít octovatět, nebo mít cizí příchutě. Náchylná na jablečno-mléčné kvašení jsou vína dlouho prokvašená s nižším obsahem kyselin a obsahující zbytkový cukr [58].



Obrázek 3: Schéma přeměny kyseliny jablečné působením bakterií mléčného kvašení na kyselinu mléčnou

Celkové množství kyselin ve víně se pohybuje kolem 5–9 g/l. Acidita vína je kolem pH 3–3,6. Celkovou kyselost zastupuje zejména kyselina vinná. Na kyselosti se kromě výše zmíněných kyselin ještě podílí anorganické kyseliny jako uhličitá a hlavně sírová. Ta vzniká reakcí oxidu siřičitého užívaného jako konzervačního činidla s vodou. Pokud by v moštu bylo naopak velmi malé množství kyselin, je povolen přídavek kyseliny vinné 1–2 g/l tak, aby celková kyselost byla 7–8 g/l [51] a [3].

Na skladbu organických kyselin mají také vliv různé nemoci vína, což je důvod pro sledování jejich zastoupení a změny. Při nedodržování hygienických a sanitárních postupů dochází v provozech k poškození vína kontaminující mikroflórou – kvasinkovou a bakteriální, méně často plísňovou. Kromě zmiňovaného octovatění vína, může nastat i křisovatění, mléčné a manitové kvašení, zvrhnutí a výskyt oxidačních příchutí. Všechny tyto jevy mají za následek změnu skladby organických kyselin a dají se podle začátku těchto změn identifikovat. Octové kvašení je způsobené octovými bakteriemi, kdy se za anaerobních podmínek mění alkohol na kyselinu octovou a oxid uhličitý. Ke křisovatění vína dochází při kvasinkovém napadení (např. *Candida mycoderma*), kdy při nízkém množství alkoholu, za přístupu vzduchu, vzniká charakteristická houbová kožka na povrchu a dochází k rozkladu alkoholu a kyselin na vodu a oxid uhličitý. U mléčného a manitového kvašení, označovaných jako nečisté kvašení, dochází ve vínech s nízkým obsahem kyselin, tříslovin a alkoholu pomocí bakterií *Bacterium manitopoeum* a *Bacterium gracille* ke tvorbě kyseliny octové, mléčné, manitolu a případně

kyseliny máselné. Zvrhnutí vína je způsobeno mikrobiálním rozkladem glycerolu, kyseliny vinné a vinného kamene na oxid uhličitý a nižší organické kyseliny, takže víno pomalu hořkne a hnědne [43].

Stanovování organických kyselin má smysl z několika důvodů. Jednak pro senzorické posouzení profilu kyselin ve víně a možnost jeho ovlivnění. Sledování umělého dokyselování jako falšování a přidávání nepovolených množství kyselin. Dále to jsou důvody technologické – sledování stavu procesu, jeho vývoje a možnost jeho okamžité regulace. Důvodem je i sledování a odhalení kontaminace a porušení technologické kázně, kdy lze včas odhalit nežádoucí kvašení, odchylky od standardního průběhu a vznik nežádoucích kyselin. To skýtá možnost včasné nápravy, nebo minimalizace škod. Důvody jsou i legislativní – sledování dodržování obsahu předepsaných látek a správná kategorizace vína. Na počátku procesu může informace o zastoupení kyselin sloužit pro získání údajů vedoucí ke správnému nastavení počátečních podmínek, jako je úprava kyselosti moštu pro správný průběh procesu. A na závěr procesu je stanovení využitelné při zmiňovaném procesu jablečno-mléčného kvašení, které musí být pozorně sledováno na vývoj a přeměny kyselin [60] a [61].

2.2.2 Separace organických kyselin s krátkým řetězcem elektromigračními technikami

Analýzy nízkomolekulárních karboxylových kyselin v bobulích, moštu, během fermentace a ve víně jsou stále publikovaným tématem už posledních 20 let a stále se objevují aktuální příspěvky na toto téma. Za poslední roky vzrostl významně počet aplikací elektromigračních metod na tyto analyty. V porovnání s jinými technikami, například nejčastěji užívanou kapalinovou chromatografií, kapilární elektroforéza nabízí několik unikátních výhod zvyšující její atraktivitu. Jde o vysoké rozlišení a účinnost separace, minimální spotřebu chemikálií, rychlé a levné analýzy [62]. Nejvíce prací bylo publikováno na analýzy majoritních krátkořetězcových organických kyselin elektromigrační technikou v uspořádání kapilární zónové elektroforézy (CZE).

Nejčastěji je využitý spektrofotometrický detekční systém využívající UV oblasti v módu přímé [63], či nepřímé [64] fotometrické detekce. Pro speciálnější případy, kdy je třeba identifikace analytů a/nebo se nalézají ve stopových množstvích je využito spojení elektromigračních technik s hmotností detekcí [65].

Vzhledem k možné miniaturizovatelnosti elektromigračních technik jsou aplikace na organické kyseliny testovány i na přenosných a čipových technikách [66]. S tím došlo zároveň k rozvoji v oblasti vodivostní detekce. V poslední době došlo k odklonění od kontaktní vodivostní detekce [67] a byla plně nahrazena nábojovou bezkontaktní vodivostní detekcí (C4D), jak uvádí přehledná review [68]. Oproti optické detekci je C4D univerzálnější. Na ionty s velkou mobilitou, které mají dostatečnou vodivost je C4D technika citlivá o několik řádů více než spektrofotometrická detekce a další výhodou je možnost vzájemné kombinace těchto detekcí [69].

Výrazná je i zmiňovaná cena analýz a časová úspora, jelikož analýzy organických kyselin trvají dle použité metody od 3 do 18 minut, takže tato metoda je vhodným kandidátem i na rutinní „on-line“ analýzy přímo ve vinařských podnicích [49].

UV spektrofotometrická detekce je nejběžnější užívanou technikou u kapilární elektroforézy a taktéž u stanovování organických kyselin. V módu přímé fotometrické detekce je z důvodu absence chromoforních skupin nutno používat vlnové délky pod 210 nm. Tato oblast vlnových délek je univerzální, takže v ní dochází k absorpci záření většinou molekul, včetně kyslíkových skupin i rozpouštědla. Je tak značně zvýšen šum pozadí a tato oblast vlnových délek je značně neselektivní [63]. Proto se výhodněji volí uspořádání nepřímé fotometrické detekce, kdy základní elektrolyt obsahuje absorbující koiont, nesoucí vhodnou chromoforní skupinu a tyto koionty jsou v průběhu separace zaměňovány v úzkých zónách za ionty analytu. Vzniká tak transparentní zóna, které se v detektoru projeví poklesem absorbance [70]. Jako nejčastější koionty v metodách na stanovení organických kyselin byly užity 3,5-dinitrobenzoová kyselina [64], 2,3-pyrazindikarboxylová kyselina [71], 2,6-pyridindikarboxylová kyselina [72], 1,2,4,5-benzen-tetrakarboxylová kyselina (pyromellitová kyselina) [73], benzoová kyselina [74] a 1,3,5-benzentrikarboxylová kyselina [75].

Další podstatnou věcí pro dobrou separaci krátkých organických kyselin v krátkém čase je z důvodu velké elektroforetické mobility těchto analytů nutno obrátit směr elektroosmotického toku [76]. Pro separaci organických kyselin bylo často publikováno použití kvarterních amoniových solí, jako jsou: cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) [64], [71], [72] a [77], cetyltrimetylamonium hydroxid (CTAH) [65], tetradecyltrimetylamonium hydroxid (TTAOH) [78], tetradecyltrimetylamonium bromid (TTAB) [79], myristyltrimetylamonium

bromid (MTAB) [80]. Dále to mohou být aminy jako například (bis-(2-aminoetyl)-amin (DETA) [81] a alkylaminy jako tetraetylenepentaamin (TEPA) [75].

Prostředí pro nepřímou fotometrickou detekci a vhodný pufr s příslušným modifikátorem elektroosmotického toku (EOF) v základním elektrolytu se volí s ohledem na stanovované analyty a požadované podmínky, tak aby při daném pH měly všechny sledované složky rozdílnou elektroforetickou mobilitu a došlo k separaci všech složek.

Přehled stanovení organických aniontů pomocí elektromigračních metod je přehledně zpracován v odborné literatuře zaměřené na review, zejména [45], [82], [61] a [49]. Komplexněji zaměřenou prací v oblasti sledování bioprocusů je [46]. Porovnání, přístupy a přehled analytických metod pro stanovení organických kyselin v roce 2016 bylo popsáno v [83].

Zájem o použití elektromigračních technik v oblasti analýz vína dokládá i počet publikací v databázi Scopus který činil za posledních 10 let 45 původních článků. Většina jich je zaměřených na sledování obsahu a významu organických kyselin ve specifických druzích vín, případně přímo v bobulích [84] a jako nástroj pro sledování projevů metabolismů a rozvoje poznání z hlediska genetiky a projevů genů na výsledné produkty.

2.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

Dnešní doba vyžaduje v mnoha oblastech nízkonákladové, přenositelné, miniaturizované a automatizovatelné systémy, schopné začlenění přímo do procesů chemických, biotechnologických, potravinářských a farmaceutických výroby, případně schopné provozu přímo na místě v životním prostředí [85].

V této kapitole bude pojednáno o přístupu a posledních trendech separačních věd v oblasti miniaturizace s ohledem na oblast kapalinové chromatografie. Nebude šířeji pojednáno o mikročipových technikách, které stojí vedle kapilárních technik, a mají ještě stále své nedostatky a specifika. Ty nebyly předmětem této práce, i když tvoří velkou oblast současného výzkumu. Stále jsou ale dominantou zejména elektromigračních separačních věd a průtokových vstřikovacích technik. Jsou povětšinou stále připravovány v jednotlivých laboratořích, takže nejsou šířeji komerčně dostupné.

S postupem rozvoje možností zmenšovat jednotlivé části přístrojové instrumentace nastal trend miniaturizace průtokových systémů [86]. Zmenšovaly se jednak jednotlivé instrumentální součásti přístrojové techniky, případně i množství nutného média (mobilní fáze, elektrolyt a vzorků), které je k analýzám potřeba [87]. Nejrychleji miniaturizovanou oblastí separačních věd byly elektromigrační metody [88]. To je zapříčiněno vzhledem k jednoduchosti instrumentálního provedení [89]. Z toho důvodu excelují v oblasti miniaturizovatelnosti zařízení a možnosti provedení těchto technik na úrovni mikročipových kanálků včetně miniaturizace dávkování vzorků [90]. Druhou oblastí, kde nastal rozvoj miniaturizace, je oblast plynové chromatografie [91], která také byla realizována na mikročipech.

Co se týče miniaturizovatelnosti separačních věd v oblasti kapalné fáze, je vzhledem k jednoduchému principu nejdále průtoková vstřikovací analýza (FIA). Od jejího prvního popisu v 70. letech dochází dnes k její realizaci na mikročipové úrovni v rozličných kombinacích a možnostech více analýz zároveň. Pohled na jejich historický vývoj podává přehledná práce [92]. Cestu od počátků FIA k mikrofluidním zařízením popisuje review [93]. Výhodné je užití FIA módu (zahrnující i miniaturizované formy FIA), pro charakterizaci jednotlivých komponent, které jsou používány v chromatografických systémech.

Oblastí s nejpomalejším rozvojem miniaturizace techniky je oblast kapalinové chromatografie. To je způsobeno vyššími nároky na instrumentální uspořádání a nedostupností miniaturizovaných komponent, které by splňovaly nároky kladené na chromatografické systémy. Teprve v poslední době došlo k výraznějšímu progresu v miniaturizovatelnosti a přenositelnosti instrumentace v oblasti kapalinové chromatografie [94].

Největším omezením rozvoje miniaturizace v oblasti kapalinové chromatografie byla nedostupnost kapilárních kolon s dostatečně malými chromatografickými částicemi, nebo monolitických kolon. Proto až v posledních letech došlo k rozvoji μ - a nano-LC technik [95]. V poslední době, kdy došlo k rozvoji 3D tiskové technologie, byla publikována práce popisující použití chromatografické kolony vytisknuté na čipu [96]. To odráží současné směry (od roku 1990) vývoje instrumentace pro separační vědy označované anglicky „lab-on-a-chip“ a „micro-total-analysis-systems“, čili laboratorní postupy a kroky umístěné na jednom čipu a celkové analýzy provedené v mikroměřítku v jednom kroku [97].

Vývoje přenositelných kapilárních a miniaturizovaných systémů pro kapalinovou chromatografii, včetně teorie a praxe, byly několikrát publikovány vědeckou společností v rámci akademického výzkumu. Většinou se jednalo o laboratorně sestavené instrumentace [98]. Jen velmi řídce byly publikovány práce zaměřené na miniaturizované a přenositelné chromatografické systémy komerčně dostupné, nebo s užitím většiny součástí komerčně dostupnými, tak aby si uživatel mohl tento systém sám poskládat, což bylo pro rozvoj této oblasti limitující.

Ranný příspěvek k oblasti přenositelných portabilních LC systémů pochází z roku 1983 [99] následovaný v roce 1996 jiným přenositelným zařízením od téhož autora [100]. Toto nové přenositelné zařízení vážilo kolem 14 kg, a tvořily jej 2 stříkačkové mikro pumpy schopné generovat gradient mobilní fáze a stále vyžadovalo napojení na síť elektrického vedení.

Řada přenositelných LC systémů, vyvíjených v laboratorních podmínkách, byla z oblasti iontové chromatografie (IC), která je méně náročná na práci s mobilní fází a na generaci gradientu, proto také první přenositelné LC systémy byly z oblasti IC [101]. Přenositelné systémy z oblasti IC díky své nenáročnosti jsou využitelné při podmínkách měření na místě, což dokladuje práce [102], kde byl užitý jednoduchý LC systém z řady nízkotlakých systémů, používající otevřené kapilární kolony.

Jednou ze současných prací v oblasti miniaturizovaných přenositelných LC systémů publikoval Sharma a kol. [103]. Zde byl popsán přenositelný nano-LC systém, napájený baterií, užívající komerčně dostupnou pumpu (VALCO, Houston, TX, USA). Tento systém poskytoval uspokojivou izokratickou separaci s detekčním uspořádáním užívajícím UV LED fotometrický detektor publikovaný samostatně o rok později [104]. Plně automatizovaný přenositelný iontový chromatograf použitelný na analýzy v místě odběru vzorku publikoval Elkin [105]. Kapilární LC a nano-LC techniky užité v analýze potravin shrnula přehledná review [106].

Filozofie návrhů miniaturizovaných LC systémů je zaměřena na flexibilitu. Tím je myšlena možnost začlenění uživatelem požadovaných kroků, jako příprava vzorků přímo v systému, nebo post-kolonová derivatizace, za současného zachování přenositelnosti systému a nízké ceny. Přehlednou nejaktuálnější review přenositelných miniaturizovaných LC systémů zpracoval Sharma a kol. [94].

Terminologie týkající se rozdílných typů LC systémů v závislosti na použitých pracovních tlacích je historicky použita v různých publikacích a může se mírně lišit. Seřazeno od nejnižšího užívaného pracovního tlaku: první místo zaujímá gravitační LC. Následuje nízkotlaká chromatografie (LPLC), která užívá peristaltické pumpy, generující tlak do 0,5 MPa, střednětlaká LC (MPLC) užívající tlaky do 10 MPa a vysokoúčinná LC (HPLC) užívající tlaky do 40 MPa. Nejvyšších tlaků dosahuje ultra vysokotlaký kapalinová chromatografie (UHPLC), posouvající hranice pracovních tlaků do 120 MPa (1200 bar). Proto v této práci je pro vyvíjenou instrumentaci užíván název střednětlaká kapalinová chromatografie (MPLC) [107].

Pokud nejméně jeden rozměr je v řádech mikrometrů, lze toto zařízení terminologicky považovat za mikrofluidické [108].

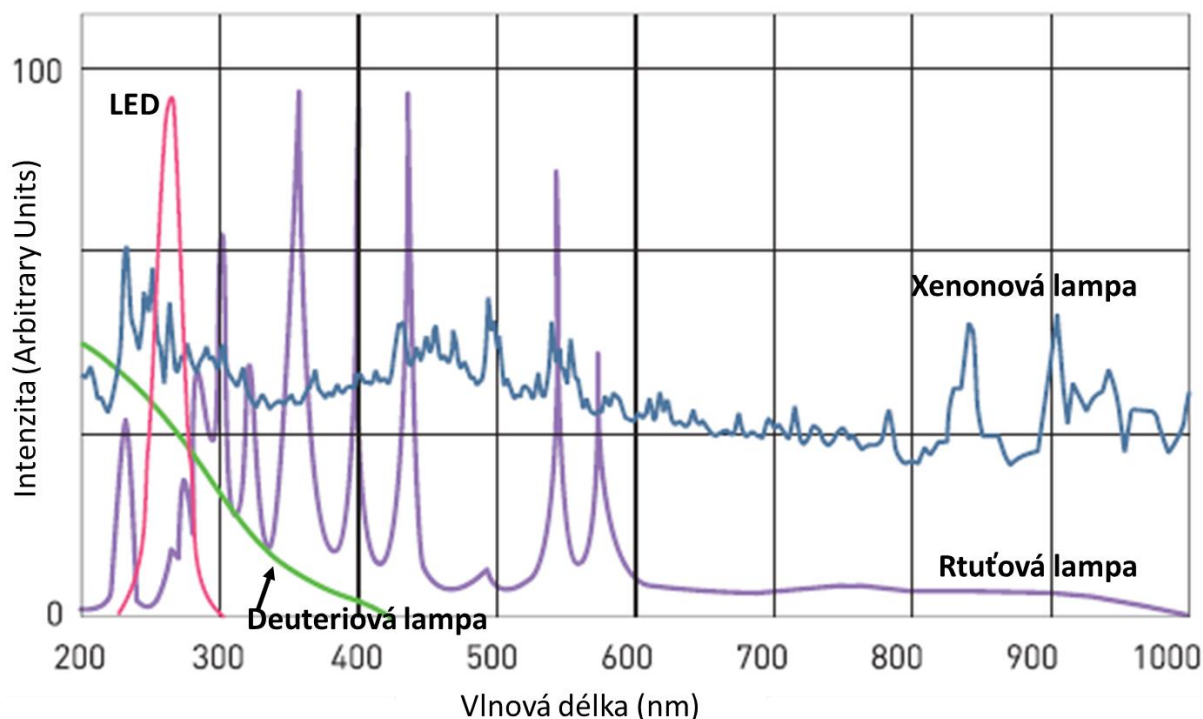
Z literární rešerše plyne, že rozvoj přenositelných systémů je otázkou několika posledních let a ještě zdaleka není vše dořešeno. Je zde poměrně široký prostor pro reálné aplikace na tyto systémy.

2.4 Elektroluminiscenční zdroje hluboké UV emise pro fotometrickou detekci

Tato kapitola pojednává o použití novějších typů elektroluminiscenčních zdrojů světla (LED) emitujících v ultrafialové (UV) oblasti (pod 300 nm) [109]. Popisovaná problematika navazuje na předchozí kapitolu, protože uvedené zdroje světla jsou s výhodou užívány ve spojení s přenositelnými a miniaturizovanými systémy.

Emise světla v hluboké UV oblasti je z analytického hlediska jednou z nejvyužitelnějších oblastí vlnových délek, zejména pro její univerzálnost, ale i selektivitu. Řada látek absorbuje kolem 280 nm (proteiny), případně kolem 255 nm (např. látky s aromatickým jádrem). Terminologicky se oblast od 200 do 280 nm označuje jako hluboká UV (z angl. deep-UV) oblast, někdy také jako UVC.

Komerčně dostupné detektory jsou běžně osazovány deuteriovými lampami, rtuťovými výbojkami, nebo xenonovými lampami. Poslední zmiňované, jako jediné, jsou schopné pulsního režimu. Všechny zmíněné zdroje vyžadují složitější řídicí elektronickou výbavu, jsou nákladné a jejich životnost je kolem 2000 hodin. Poskytují i rozdílné spektrální emisní profily a pro jejich využití pro danou vlnovou délku je nutné použít optické filtry, nebo mřížku. Výhodou LED zdrojů je jejich selektivita, protože emitují záření v úzkém rozmezí vlnových délek. Jsou schopné pracovat v pulsním módu, což je výhoda pro zvýšení intenzity záření a i pro větší životnost – výrobci LED zdrojů pro UV oblast v dnešní době udávají až 6000 hodin. Spektrální charakteristiky různých zdrojů záření zobrazuje Obrázek 4 [110].



Obrázek 4: Spektrální charakteristiky různých zdrojů světelného záření [110].

2.4.1 Použití LED zdrojů pro hlubokou UV oblast v potravinářství a analytické instrumentaci

Jednou z nejrozšířenějších oblastí použití hluboké UV emise, v poslední době zasahující i do oblasti užití LED zdrojů, je oblast sterilace povrchů, potravin a kapalin [111].

V potravinářství jsou také užívány pro kontrolu patogenních mikroorganismů [112], případně na sterilaci povrchů tuhých potravinářských materiálů, například plátkových sýrů [113].

S rozvojem LED technologie, zvyšováním životnosti a výkonu LED zdrojů poskytujících emisi záření v hluboké UV oblasti se tyto zdroje čím dál více prosazují v oblasti analytické instrumentace jako součást detekčního systému. První větší přehled užití LED zdrojů v optických detektorech a příslušnou ovládací elektroniku shrnul Dasgupta v roce 2003 [114]. Aktualizovaný přehled a trendy LED instrumentace z pohledu analytické chemie publikoval v roce 2014 Macka a kolektiv [115].

Poslední stav tématu LED zdrojů v oblasti analytických zařízení byla shrnuta v přehledné práci [116].

Samostatné odvětví využití LED zdrojů v miniaturizovaných analytických systémech je jejich užití ve fluorescenčních detekčních zařízeních, což popisuje například práce autorů Vaculovičové a kol. [117]. Zde je použito mikrodiodové pole, které bylo kolimovatelné a světelný signál přenášen pomocí optických kabelů. Použití mikrodiodového pole, které má velkou intenzitu a dá se bodově zaměřovat je jeden ze současných trendů užití LED zdrojů.

Jednou z prvních prací v oblasti použití hluboké UV emise z LED zdroje v analytické instrumentaci (kapilární elektroforéze) byla popsána v [118], kde byly ocharakterizovány vlastnosti 255 nm LED zdroje a po zapojení do analytického elektroforetického systému byla otestována detekce separovaných bazí nukleotidů. LED detektor byl realizován jednoduchým způsobem vysoustruženým držákem na štěrbinu, v níž byla umístěna kapilára, z jedné strany byla umístěna LED a z druhé strany fotonásobič jako detekční zařízení. Uspořádání a charakterizace tohoto detektoru bylo popsáno v práci [119]. Rohrbasser a spol. použili 255 nm LED na elektroforetickém systému pro stanovení HIV léčiv, ale za použití výrazně složitější elektroniky zahrnující i zpracování dat [120].

Použití hluboké UV emise (255 nm LED v absorbančním detektoru pro kapalinovou chromatografii) bylo poprvé popsáno v [121]. Byla popsána konstrukce detekční cely, elektronické zapojení LED a fotodiody a otestování detekce separace modelové směsi benzoátů na koloně C18 izokratickou elucí. Odlišné uspořádání absorbančního detektoru pro HPLC systém bylo popsáno v [122]. Autoři zde použili referenční fotodiodu a elektronický okruh pro výrazné snížení hladiny šumu základní linie, který se pohyboval v řádech jednotek μAU . Použitelnost systému demonstrována na směsi léčiv a fenolických látek; a pro testování byly použity LED zdroje emitující záření o vlnové délce 280 a 255 nm. Použití LED zdroje bylo porovnáváno s komerčním detektorem používající deuteriovou lampu. Autoři Bui a spol. použili podobné uspořádání s úpravou štěrbinu pro HPLC systém s kolonami o úzkém průměru (použita C18 kolona o rozměrech 150 x 1 mm) [123]. Sharma a spol. popsali použití LED UV absorpčního detektoru s velmi nízkým detekčním limitem pro kapilární kapalinovou chromatografii [104]. Autoři popsali limity detekcí v řádech $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, způsob filtrace šumu a uspořádání detekční cely. Separace byla demonstrována na modelové směsi polyfenolických látek.

Autoři Bui a Hauser použili novější LED zdroje pro UV emisi (založené na odlišném materiálovém substrátu) v detekčním systému pro kapilární elektroforézu [124].

Miniaturizované LED detektory se užívají standardně zejména u přenositelných chromatografických a elektroforetických systémů a jejich popisy jsou součástí literatury uvedené v kapitole 2.3.

2.4.2 Současný stav a trendy LED zdrojů pro hlubokou UV oblast

V současné době se vývoj LED technologie zaměřuje na dosažení co nejnižších vlnových délek v UV oblasti. Problémem je jejich životnost a cena technologie. Obecně platí, že čím nižší vlnová délka tím nižší je životnost LED zdroje (někdy i jen pár hodin) a roste cena [125].

Největší pozornost výzkumu je v současné době věnována vývoji LED v oblasti 220 až 280 nm [126]. Materiálové substráty použitelné jako polovodiče pro přípravu LED s emisí v UV oblasti jsou převážně dva. První je historicky dříve používaný a stále ještě vyvíjený substrát založený na AlGaIn [127]. Druhý substrát, rozšiřující se v poslední době, je založený na AlN [128]. Při přípravě LED zdrojů se používá i jejich kombinace [125]. Cílem vývoje polovodičů je zvyšování životnosti, ale i optického výkonu LED zdrojů [129]. V současné době byly publikovány i práce vývoje LED zdrojů dosahujících 222 nm [130]. UV zdroje o vlnových délkách kolem 230 nm jsou potenciálně využitelné například ve fotoionizačním detektoru na plynovou chromatografii. Problémem je stále životnost těchto zařízení, zejména pro vlnové délky pod 250 nm dosahujících v praxi jen několika hodin. Životnost se dá zvýšit použitím pulsního režimu, tzn. vybudit emisi vložím přerušovaného proudu po krátké časové úseky s dostatečnou frekvencí. UV LED se silnějším výkonem jsou využitelné spíše pro sterilace povrchů [113]. Co se týče použití UV LED v analytické instrumentaci je důraz kladen zejména na životnost a plně postačuje optický výkon kolem 0,5 mW [131].

Současný trend je miniaturizace LED zdrojů až na úroveň čipu, se zachováním optického výkonu pro možnost použití jako zdroje fluorescence např. pro analýzy v reálném čase a přímo v požadovaném prostředí [132]. Tímto směrem se ubírá i vývoj LED pro UV oblast založených na polovodičových substrátech na bázi nitridů [133].

Charakterizací LED zdrojů pro UV oblast, zejména starší (AlGaIn) řady, se zabírala práce z roku 2015 [134]. Autoři se zaměřili na charakterizaci LED zdrojů, jejich spektrálních

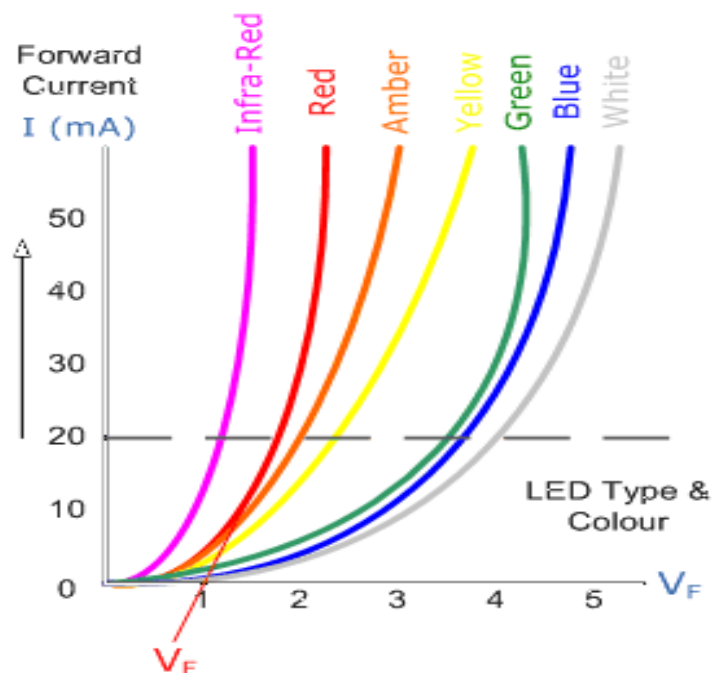
charakteristik, optoelektrických vlastností a posouzení termální emise. Výzkum byl zaměřen na získání údajů pro vhodnost použití LED zdrojů ve vesmírných aplikacích.

Zatím žádný z dostupných článků nerozebíral původ parazitního emisního pásu, které se objevuje u UV LED zdrojů zejména pro oblast kolem 255 nm. K parazitní emisi dochází v oblasti viditelné části spektra okolo 350 – 500 nm. Zde je patrné viditelné modrofialové záření. Výrobce UV LED zdrojů založených na AlN materiálovém substrátu (CRYSTAL IS) slibují minimalizaci tohoto parazitního emisního pásu oproti jiným materiálovým substrátům [135].

Proto byla v této práci pozornost zaměřena na charakterizaci UV LED zdrojů založeném na AlN materiálovém substrátu, který zatím nebyl širěji charakterizován z hlediska vlastností využitelných v analytické chemii.

Součástí zhodnocení vlastností LED detektoru z pohledu analytické chemie bývá charakterizace způsobem jako ve zmíněných publikacích uvedených v kapitole 2.4.1., kdy byla užitá metodika popisovaná autory Macka a spol. [136]. Ta přesně popisuje stanovení linearity detektoru a efektivní délku optické dráhy.

Z hlediska optoelektrických vlastností stojí za zmínku trend LED zdrojů, že se vzrůstem emitované vlnové délky snižují nároky na nutné vložené napětí, jak ukazuje Obrázek 5. To značí, že UV oblast má nejvyšší nároky na výši vkládaného napětí oproti LED zdrojům z oblasti viditelného záření [137] a korelaci popisuje i přehledný článek [116].



Obrázek 5: Chování LED zdrojů emitujících různé vlnových délek v souvislosti s nutným dodaným napětím [116].

3 CÍLE PRÁCE

3.1 Využití kapilární elektroforézy při analýze kaseinových frakcí a v procesu fermentace vinného moštu

- Optimalizace analytické separace základních kaseinových frakcí v lyofilizovaném kravském mléce pomocí metody kapilární elektroforézy s cílem zlepšení účinnosti separace oproti publikovaným pracím.
- Optimalizace postupu a aplikace kapilární elektroforézy při stanovení základních organických kyselin ve vinném moštu.
- Aplikace optimalizovaného systému ke sledování změn profilu organických kyselin v průběhu kvašení vinného moštu vybranými kvasinkami.

3.2 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

- Z dostupných komerčních součástí sloužících jako mikrofluidické zařízení na promývání mikročipových kanálků, kapilární kolony a vstřikovacího ventilů navrhnout, zapojit a otestovat možnost užití této sestavy jako mikrofluidický přenositelný chromatografický systém.
- Použití elektroluminiscenčních zdrojů hluboké UV emise pro fotometrickou detekci.
- Charakterizovat nově dostupné LED zdroje pro hlubokou UV emisi, založené na nověji používaném materiálovém substrátu (AlN). Ověřit spektrální charakteristiky a optoelektrické vlastnosti a porovnat tyto vlastnosti s LED zdrojem založeném na polovodičovém substrátu (AlGaIn).
- Otestovat miniaturizovaný chromatografický systém v izokratickém i gradientovém módu za použití jednoduchého absorbančního detektoru o různých vlnových délkách, hlubokého UV LED absorbančního detektoru při separaci modelových analytů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu kaseinů

Chemikálie a vzorky

Standardy izolátů frakcí kaseinů z kravského mléka: α_s -kasein (70 %), β -kasein (90 %) a κ -kasein (80 %), vše od Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Chemikálie na přípravu pufrů a elektrolytů: dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema, s.p., Brno, Česká republika), močovina (99,5 %, p.a., Lachema, s.p., Brno, Česká republika), hydroxypropyl-methyl-celulosa (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo), kyselina orthofosforečná (85 %, Lachema, a.s., Neratovice, Česká republika), hydroxid sodný (Lachema, s.p., Brno, Česká republika), DL-dithiothreitol (99 %, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), kyselina octová (99,8 % p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), dichlormetan (Lachema, s.p., Brno, Česká republika), mesityloxid (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko), TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo), kyselina chlorovodíková (35 %, Lachema, a.s., Neratovice, Česká republika).

Vzorky lyofilizovaného mléka dodal Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Oddělení fyziologie výživy zvířat, pracoviště Pohořelice.

Analytický separační a detekční systém

Použité experimentální postupy a chemikálie vycházejí z diplomových prací Ing. Ivany Mičíkové [151] a Ing. Ireny Dvořákové [138] popsané v kapitole 3 (Experimentální část).

Příprava roztoku základního elektrolytu

Jako základní elektrolyt byl použit $20\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr. Ten byl připraven rozpuštěním 179,4 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 25 mg hydroxypropyl-methyl-celulosity v 37,5 ml

8mol.dm⁻³ močoviny. Pomocí 4mol.dm⁻³ kyseliny orthofosforečné bylo nastaveno pH 2,5 a roztok byl doplněn vodou na objem 50 ml.

Příprava redukčního pufru

Redukční pufr slouží pro rozpuštění lyofilizovaného mléka a standardů pro analýzy v roztoku základního elektrolytu.

Redukční pufr byl připraven rozpuštěním 1,5138 g TRIS v 50 ml vody, k tomu bylo přidáno bylo přidáno 77,1 mg dithiothreitolu (DTT) a 24,024 g močoviny. pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 8,8.

Příprava roztoků standardů

Navážky standardů jednotlivých lyofilizovaných kaseinů či vzorků byly rozpouštěny zředěním redukčním pufru (redukční pufr : voda = 1 : 1). Byly připraveny standardní roztoky o koncentraci 12 mg/ml. Před analýzou byly roztoky inkubovány minimálně 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně filtrovány přes stříkačkový filtr s pórovitostí 0,45 µm.

Separační podmínky použité pro analýzu kaseinových frakcí

Separace probíhala v základním elektrolytu popsaného výše. Prostor kapiláry byl termostatován na 30°C. Dávkování vzorku do kapiláry bylo hydrodynamicky 5 kPa po dobu 18 sekund. Separační napětí bylo +30 kV. Měřený elektrický proud se pohyboval kolem 45 µA. Analyty byly detekovány při 214 nm. Mezi analýzami byla kapilára promývána při 150 kPa vodou (1 minuta), 1mol.dm⁻³ NaOH (3 minuty); vodou (3 minuty) a základním elektrolytem (5 minut). Byla použita křemenná tažená kapilára v místě detekčního okénka s odstraněným polyimidem. Vnitřní průměr kapiláry byl 50 µm, vnější 360 µm, celková délka 125 cm a efektivní délka 100 cm.

Identifikace kaseinů v elektroforeogramu

Analýzou jednotlivých standardů kaseinů a směsného standardu, ve kterém byly tyto kaseiny zastoupeny ve stejném poměru, byly identifikovány a určeny jednotlivé frakce kaseinů srovnáním s literaturou popsanou v kapitole 2.2.4. U identifikovaných kaseinových frakcí byla

stanovena koncentrace jednotlivých frakcí výpočtem z kalibrační závislosti srovnáním se standardy.

Izolace kaseinů z mléka

Z reálných vzorků nadojeného mléka o objemu 10 ml se nejprve izolovaly kaseiny. Vysrážení kaseinů proběhlo při pH 4,6 za pomoci 10 % kyseliny octové. Následovalo odstředění při 8500 otáčkách/min po dobu 15 minut. Po té se mechanicky odstranil viditelný tuk z povrchu a slila se syrovátka. K úplnému odstranění tuku bylo k peletu přidáno 5 ml dichlormethanu a 5 ml vody. Následovala centrifugace 15 minut (8500 otáček/min), slití syrovátky a opět bylo přidáno 5 ml dichlormetanu a 5 ml vody. Po centrifugaci, která trvala opět 15 minut (8500 ot/min), byla syrovátka odlita a pelet byl vyškrabán do lyofilizační misky lyofilizován. Lyofilizované vzorky byly poté umístěny do označených mikrozkušnic a uchovávány v lednici (4°C).

Bylo připraveno a zanalyzováno 144 vzorků o navážce 12 mg/mL.

Podrobné složení krmné dávky, uspořádání a rozvržení výživového pokusu a přehled odběrových period byly popsány v diplomové práci Ireny Dvořákové [138].

Odběry a zpracování vzorků

V experimentální části každé periody byly 3x týdně odebírány vzorky mléka z každého dojení na stanovení obsahu základních složek mléka a obsahu kaseinových frakcí. Pro stanovení základních složek byly odebrány vzorky z ranního a večerního mléka, které byly konzervovány 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diolem (Bronopol), zchlazeny na 6 °C a analyzovány infračerveným absorpčním analyzátozem (Bentley Instruments 2000, Bentley Instruments Inc., USA). Stanovení organických a dalších složek není součástí této práce. Pro stanovení obsahu kaseinových frakcí byly odebrané vzorky mléka zamrazeny a při -20°C a uchovány do zpracování.

4.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Uspořádání fermentační části experimentu

V experimentu bylo užito 4 druhů vinného moštu. Mošty se lišily jednak druhem produkce (integrovaná a ekologická) a každá produkce byla zastoupena moštem z červené i bílé odrůdy. Všechny mošty byly z produkce ročníku 2010 dodané lokálním vinařstvím (Rodinné Vinařství Holánek, Iváň, Česká Republika) z mikulovské viniční podoblasti. Každý z těchto moštů byl zaočkován kvasinkami z komerčně dostupnými sušenými vinnými kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* (komerční označení BS6, Vinařské potřeby, Česká republika) a paralelně ten samý druh moštu byl zaočkován izolovaným autochtonním kvasinkovým kmenem *Saccharomyces cerevisiae* (1-09). Podrobnosti o použitých postupech izolace a charakterizace kvasinek stejně tak detaily o provedené fermentaci jsou uvedeny v dizertační práci [139].

Z každé fermentace byl odebírán vzorek moštu. První odběr byl proveden hned po zaočkování a následně bylo provedeno dalších 11 odběrů. Schéma experimentu a odběrů je uvedeno v tabulce 1. Odebrané vzorky byly zamrazeny a analyzovány v jednom časovém celku po skončení fermentací.

Tabulka 1: Schéma uspořádání fermentací a časy odběru vzorků.

Odrůda:	Rulandské modré				Odrůda:	Sauvignon	
Produkce:	Integrovaná	Integrovaná	Ekologická	Ekologická	Produkce:	Ekologická	Ekologická
Produkční kultura:	Komerční	Izolovaná	Komerční	Izolovaná	Produkční kultura:	Komerční	Izolovaná
Datum odběru	Den fermentace/odběru				Datum odběru	Den fermentace/odběru	
3.10.2010	1	1	1	1	25.9.2010	1	1
5.10.2010	3	3	3	3	27.9.2010	3	3
8.10.2010	6	6	6	6	29.9.2010	5	5
10.10.2010	8	8	8	8	1.10.2010	7	7
12.10.2010	10	10	10	10	3.10.2010	9	9
15.10.2010	13	13	13	13	5.10.2010	11	11
17.10.2010	15	15	15	15	8.10.2010	14	14
19.10.2010	17	17	17	17	10.10.2010	16	16
8.11.2010	37	37	37	37	12.10.2010	18	18
20.12.2010	79	79	79	79	15.10.2010	21	21
6.3.2011	155	155	155	155	8.11.2010	45	45
					20.12.2010	87	87
					6.3.2011	163	163

Analytický separační a detekční systém

Použitá metodika byla převzata z publikovaného zdroje [64] s optimalizací místa nástřiku a podmínek promývání pro zajištění opakovatelnosti.

Kapilární elektroforetický systém PrinCE 460 (PrinCE Technologies B.V., Emmen, Neederland) byl propojen s UV-VIS detektorem Spectra SYSTEM UV2000 (Thermo Separation Products Inc., San Jose, USA). Užita byla vnitřně nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm (MicroSolv Technology Corporation, Long Branch, NJ, USA). V místě detekce byla odstraněna vrstva polyimidu pro vytvoření transparentního okénka. Data byly zaznamenávány pomocí software CSW 1.7 (DataAppex, Praha, Czech Republic). Dávkování vzorku do kapiláry bylo realizováno na outletové straně. Celková délka kapiláry byla 75 cm a efektivní délka činila 25 cm. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky podtlakem 50 mBar po 6 sekund. Nepřímá fotometrická detekce byla sledována při 254 nm. Pro analýzu byla použita negativní polarita konstantního napětí -30 kV.

Kapilára, inletový a outletový prostor byl naplněn základním elektrolytem, který obsahoval vodný roztok 10 mol.dm^{-3} kyseliny 3,5-dinitrobenzoovou (Penta, Česká republika) a 0,2 mol.dm^{-3} CTAB (Sigma-Aldrich, Švýcarsko). pH bylo nastaveno na 3,2 pomocí roztoku NaOH (Penta).

Každý den před měřením byla kapilára prekondicionována promýváním 1 mol.dm^{-3} NaOH (1200 mBar, 20 min), vodou (1200 mBar, 10 min) a základním elektrolytem (1200 mBar, 10min). Mezi analýzami byla kapilára promývána pouze základním elektrolytem (1200 mBar, 5 minut) za působení vloženého konstantního napětí +25 kV (normální polarita).

Všechny reagenty a standardy byly čistoty p.a. s obsahem látky 97% a vyšší. Standardy organických kyselin byly od firmy Sigma-Aldrich, Švýcarsko. Připraveny byly základní roztoky standardů každý o koncentraci 2 g.dm^{-3} , ze kterého byla připravována příslušná ředění. Roztoky byly skladovány v lednici při 4°C. Pro rozpouštění chemikálií byla užita přečištěná voda (Milli-Q) s vodivostí pod 0,10 mS.m^{-1} . Všechny roztoky a vzorky byly filtrovány přes celulosové membránové mikrofiltry s pórovitostí 0,45 μm (VWR, Česká republika). Teplota celého systému byla udržována na 25°C. Vzorky fermentovaného moštu byly ředěny vodou a filtrovány, bez další úpravy.

4.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

Experimentální postupy, uspořádání a užitá instrumentace jsou popsány v odborné publikaci prošlé recenzním řízením. Publikace vložena do kapitoly 11.

4.4 Použití k elektroluminiscenčním zdrojů (LED) hluboké UV emise pro fotometrickou detekci na přenosných systémech

Použité elektroluminiscenční zdroje záření (LED) a fotodiody

Byly testovány komerčně dodávané LED zdroje, emitující záření v oblasti vlnových délek pod 300 nm, založené na odlišném materiálovém substrátu (nitridy hliníku – AlN). Všechny tyto UV LED jsou k dohledání pod katalogovým označením OPTAN255H (255 nm), OPTAN255J (255 nm) a OPTAN280J (280 nm) a byly dodány společností CRYSTAL IS, NY, USA. Dříve používané UV LED zdroje byly založené na substrátu obsahující nitridy hliníku s galiem (AlGaIn). Charakterizaci této dřívější řady se zabývala práce [140]. LED zdroje charakterizované v této dizertační práci byly porovnávány a charakterizovány stejnými postupy jako LED v publikované práci, která testovala LED s označením UV TOP-255HL-TO39 dodaných společností SETI, SC, USA. Jednotlivé parametry byly porovnávány s daty naměřenými ve výše zmíněné publikaci. Pro úplnost a přehlednost jsou dále uvedena schémata a popis použitých metodik pro charakterizaci LED zdrojů.

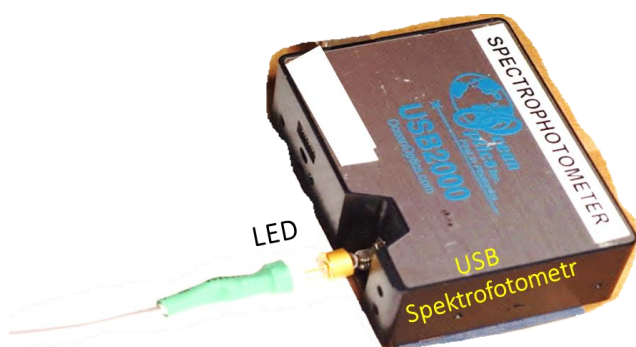
Fotodioda pro charakterizaci LED zdrojů z hlediska jejich optického výkonu byla založena na křemíkové bázi a schopná detekovat záření v UV oblasti. Byla užitá fotodioda s velkou aktivní plochou (100 mm²) pro zachycení co největší míry dopadajícího záření. Tato fotodioda byla od společnosti Edmund Optics, NJ, USA. Fotodioda byla bez vestavěného předzesilovače signálu, takže signál, řádově v μA , byl zachycován citlivým multimetrem, nebo násoben externím předzesilovačem.

Pro detekci UV záření procházejícího přes kapiláru v absorbančním detektoru byla použita fotodioda s malým aktivním povrchem (pod 1 mm²), pro minimalizaci zvyšování šumu okolním signálem. Byla pořízena fotodioda s katalogovým označením TOCON_ABC2

od společnosti SgLux, Německo. Obsahovala vestavěný předzesilovač signálu, takže mohla být přímo napojena na zařízení zaznamenávající změny hodnot napětí. Pro lepší zaostření signálu byla volena varianta s hemisférickou čočkou.

Postupy a instrumentace pro charakterizaci LED zdrojů

Pro spektrální charakterizaci emitovaného signálu byl použit miniaturizovaný USB spektrofotometr USB2000+XR1-ESOO2000+ (Ocean Optic, Germany). LED zdroje byly přiloženy na vstup do spektrofotometrické štěrbinou (souběžně se štěrbinou). Situaci zobrazuje Obrázek 6.



Obrázek 6: Měření spektrálních charakteristik LED zdrojů – LED těsně přiléhající na USB spektrofotometr.

Byly zaznamenávány změny spekter při měnícím se vložném napětí na LED zdroje. Pro tyto účely byla LED napojena na zdroj konstantního proudu DC Power Supply PS-3005D, Wavecom Instruments, SA, Austrálie, na kterém byla nastavena hodnota vkládaného napětí, a zároveň bylo možno odečítat hodnotu procházejícího proudu. Toto měření poskytovalo informaci o závislosti hodnoty napětí a proudu a vliv těchto veličin na emisi záření v hluboké UV a viditelné (VIS) oblasti. Ze spektrofotometrického měření byla určena poloha hlavního píku emitovaného záření (pík s nejvyšší intenzitou) a z jeho pološířky (šířka v polovině jeho výšky) byla určena hodnota pro porovnávání.

Měření zářivého výkonu (mW) a elektrického výkonu (mW) probíhalo v uspořádání, kdy LED zdroj byl v těsné blízkosti umístěn a namířen na fotocitlivou plochu (100 mm²) fotodiody (Edmund Optics, NJ, USA). LED byla napojena na nastavitelný konstantní zdroj proudu (0 až 100 mA) popsany v publikaci [141]. Na LED byl napojen multimetr Digitech QM1535 (Jaycar, NSW, Australia), pro snímání hodnoty napětí (V) na LED. Druhý multimetr Tenma 72-7740 (Springboro, Ohio, USA) byl napojený na fotodiodu pro snímání hodnoty

The diagram illustrates a circuit setup for measuring the current and voltage of a photodiode. A central component is a **Křemíková fotodioda (100 mm²)** (Silicon photodiode, 100 mm²). It is connected to two multimeters and a constant current source.

- Left Multimeter:** A yellow digital multimeter (YENMAK 79-7700) is connected to the photodiode. It displays a reading of **009.7** μA . The label **Signál z fotodiody (μA)** (Signal from photodiode (μA)) points to this meter.
- Right Multimeter:** A yellow digital multimeter (UNI-T UT109C) is connected to the photodiode. It displays a reading of **06.41** V. The label **Napětí na LED (V)** (Voltage on LED (V)) points to this meter.
- Constant Current Source:** A small black device with a digital display and three knobs is connected to the photodiode. The label **Zdroj konstantního proudu** (Constant current source) points to this device.
- LED:** A small component labeled **LED** is connected to the circuit.
- Photodiode Detail:** An inset image shows a close-up of the photodiode's internal structure, with a label **Křemíková fotodioda (100 mm²)** pointing to it.

Na základě hodnot proudu vloženého na LED a hodnoty napětí odečteného na multimetru, bylo možno počítat hodnotu elektrického výkonu, P_{el} (W), dle Rovnice 1, kde U_{LED} (V) je napětí naměřené na LED zdroji a I_{LED} (A) je proud vložený na LED zdroj.

Zářivý výkon pro jednotlivé LED zdroje, P_{rp} (W), byl počítán z hodnot fotoproudu generovaného fotodiodou po dopadu zářivého toku, I_{PH} (A), a hodnoty poměru fotoproudu a výkonu pro příslušnou vlnovou délku, I_{SR} (A/W), získané z technické dokumentace k fotodiodě. Výpočet uvádí Rovnice 2. Měření bylo 3 krát opakováno a z hodnot byl udělán aritmetický průměr a pro měření stanovena směrodatná odchylka. Pro testování byly vybrány 3 komerčně dostupné LED zdroje na hlubokou UV oblast: 255 nm o udávaném výkonu do 1 a do 2 mW a 280 nm o udávaném výkonu do 2 mW a pro srovnání s LED zdrojem z viditelné oblasti spektra, byla zvolena běžně používaná LED na modré světlo (470 nm o udávaném výkonu 7200 mcd). Pro nesnadnost přepočtu na unifikované jednotky bez znalosti dalších parametrů jsou uvedeny hodnoty a jednotky udané výrobcem. Hodnoty

fotoproudu na jednotku výkonu pro použitou fotodiodu zaslané výrobcem (Edmund Optics, USA) byly pro 255 nm 0,1125 A/W, pro 280 nm 0,115 A/W a pro 470 nm 0,242 A/W.

$$P_{rp} = I_{PH}/I_{SR} \text{ (Watt)} \quad \text{(Rovnice 2)}$$

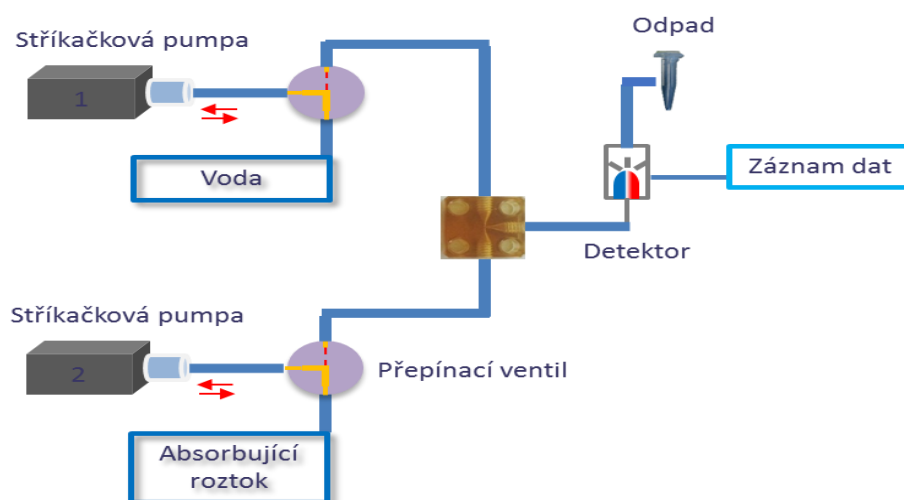
Uspořádání a charakterizace fotometrického detekčního systému

Pro detekci analytů procházející křemennou kapilárou byl užitý jednoduchý LED absorbanční detektor [141]. V tomto případě novost spočívala v užití známého uspořádání na detekci v hluboké UV oblasti s novým typem LED zdrojů. Jako zdroj světla v hluboké UV oblasti byly použity testované komerční LED (CRYSTAL IS, NY, USA) a jako fotodioda byla užita TOCON_ABC2 (SgLux, Německo). Fotodioda vyžadovala napájení 5 V a byla napojena na elektronický okruh pro výstup v absorbančních jednotkách (popsaný v téže publikaci), který byl napojený na sběr a záznam dat přes komunikační rozhraní eDAQ e-Corder 401 (Sydney, SA, Austrálie). Záření z LED (napájecí proud obvykle 10 mA) procházelo přes komerčně dostupnou šterbinu pro kapiláry uzpůsobenou pro vnější průměr 360 μm a 50 μm vnitřní průměr, značená zeleně, dodávanou společností Agilent (Německo), V místě průchodu záření byla kvůli transparentnosti odstraněna vrstva polyimidu kryjící kapiláru. Stejné zapojení bylo použito a popsáno i v publikaci týkající se kapitoly 4.3.

Pro základní charakterizaci uvedeného detektoru byl zvolen postup pro charakterizaci absorbančních detektorů dle publikace [142]. Pro testování linearitu detektoru a efektivní délky kapiláry v takto užitém uspořádání pro hlubokou UV oblast byl zvolen roztok šestimocného chromu (dichromanu draselného), který dostatečně absorbuje v oblasti kolem 255 nm. Pro zajištění šestimocného chromu namísto trojmocného byl roztok dichromanu draselného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozpuštěn v zásaditém prostředí 50mM roztoku hydroxidu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Byla připravena série roztoků (ředěním) od nejkonzentrovanejšího roztoku 1000 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), který vytvářel dostatečně silné absorpční prostředí, po nejnižší koncentraci 0,03 mmol/dm^3 , který byl na hranici absorbančního šumu. Postupně byly dávkovací smyčkou (20 μL) vstřikovány jednotlivé roztoky dichromanu v pořadí od nejméně koncentrovaného po nejkonzentrovanejší vstřikovacím ventilem do kapiláry tak, že absorbance zóny barviva

poskytla konstantní signál a poté byla kapilára propláchnuta rozpouštědlem bez absorbující složky pro návrat absorbance na základní linii. Byla zaznamenávána absorbance. K ovládání průtoků a proplachu kapiláry byla využita modulární sestava jako v kapitole 4.3. Dvě pumpy dodávaly rozpouštědlo (50mM hydroxid sodný ve vodě) a byly propojeny přes přepínací ventil s vstřikovacím ventilem s dávkovací smyčkou, do které byl externě stříkačkou vpravován absorbující roztok. Kapilára napojená na vstřikovací ventil procházela testovaným detektorem.

Každá koncentrace byla do kapiláry dávkována 3 krát. Z průměrné hodnoty absorbance jednotlivých poloh maxim píků v ploché části byl udělán průměr. Hodnota absorbance byla odečtena od hodnoty absorbance základní linie, aby došlo k eliminaci chyby dané nenulovou pozicí základní linie. Absorbanční signál byl zaznamenáván na záznamovém a vyhodnocovacím zařízení eDAQ e-Corder 301 (Sydney, SA, Austrálie) propojené s počítačem. Jednotlivé body byly vyneseny do grafu jako závislost citlivosti S (Absorbanční jednotka/mol.dm⁻³) na absorbanci, A (AU), pro jednotlivé měřené roztoky dichromanu draselného a byly extrapolovány krajní body na obou koncích grafické závislosti. Počáteční body zatížené příliš velkou chybou nebyly zahrnuty do grafu. Extrapolovaná přímka protínající osu x a y v grafu poskytovala hodnoty pro výpočet % bočního světla (Stray light), %SL (%), a efektivní délky kapiláry, L_{eff} (m). Obdobným způsobem byla testována i nanolitrová průtoková Z-cela, jejíž specifikace budou uvedeny dále. V tomto případě se doprava různých roztoků do kapiláry prováděla pomocí dvou pump, kdy jedna pumpa dodávala vodu a druhá pumpa nasávala a vytlačela roztok absorbujícího barviva. Schéma tohoto uspořádání zobrazuje Obrázek 8.



Obrázek 8: Schéma uspořádání experimentu na testování efektivní délky a linearity pro optické detektory.

Molární absorpční koeficient, ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$), pro roztok dichromanu draselného v 50 mmol/dm^3 vodném rozpouštědle byl určen proměřením spektra roztoku dichromanu o známé koncentraci pomocí spektrofotometru Metertech SP-8001 UV/Visible Spectrophotometer (Nankang, Taipei, Taiwan) a vypočítán pro hodnotu 255 nm pomocí Lambert-Beerova zákona Jeho hodnota byla stanovena na $2624 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ a byla vzata pro další výpočty efektivní délky kapiláry. Rovnice pro výpočet efektivní délky a linearitu vyjádřené v % bočního světla jsou dány rovnicemi 3 a 4.

$$L_{eff} = S/\epsilon \text{ (m)} \quad \text{(Rovnice 3)}$$

$$\%SL = 100 \times 10^{-A} \text{ (\%)} \quad \text{(Rovnice 4)}$$

Aplikace LED fotometrického detekčního systému na přenosném miniaturizovaném chromatografickém systému

Nové řady UV LED zdrojů byly testovány v detekčním systému v několika uspořádáních. Byly zvoleny modelové analyty pro separace na koloně i pro průtokovou vstřikovací analýzu. Rovněž byla testována možnost tandemové techniky spojení optické detekce a elektrochemické

LED detektor popisovaný v předchozí kapitole, byl zapojen na vyvinutý modulární miniaturizovaný chromatografický systém popisovaný v kapitole 4.3. Do systému byla za vstřikovací ventil vsazena monolitická kolona $138 \times 0.1 \text{ mm}$ RP-C18 CapRod monolithic column (Merck, Austrálie), která byla v propojovacím konektoru napojena a šroubením zafixována s kapilárou o vnitřním průměru $100 \mu\text{m}$) procházející skrz štěrbinu detektoru. V tomto zapojení byla použita LED OPTAN255H (Crystal IS, NY, USA) a fotodioda TOCON_ABC2 (SgLux, Německo). LED byla napájena proudem 10 mA a fotodioda napětím 5 V. Na kolonu bylo vstřikováno 4 nL směsi modelových analytů, která byla složena ze 4 forem parabenů: Methyl ($0,28 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Ethyl ($0,16 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Propyl ($0,16 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a Butyl ($0,17 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechny parabeny byly obdrženy od Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Základní roztoky parabenů byly rozpuštěny ve směsi voda-acetonitril v poměru 50:50. a jejich směs byla 2x ředěna acetonitrem na výslednou koncentraci acetonitrilu 33%. Jako mobilní fáze na izokratickou eluci byla zvolena směs $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ octanu amonného a acetonitrilu

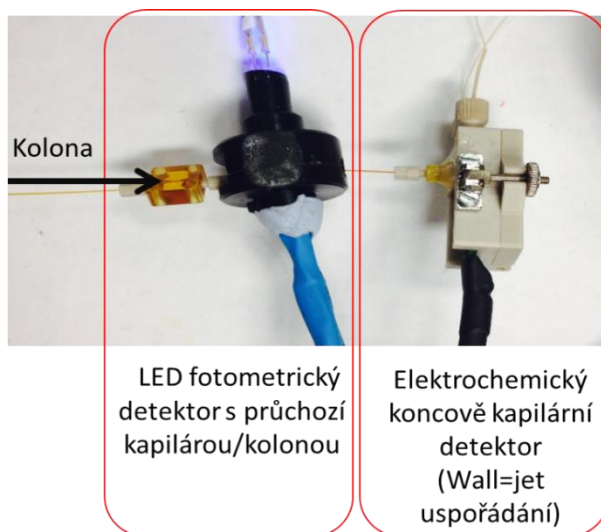
v poměru 80:20. Byl užit průtok 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Data byla zaznamenávána záznamovým a vyhodnocovacím zařízením eDAQ e-Corder 401 (Sydney, SY, Austrálie) a užit software Chart 5.5.17b5. Sběr dat byl s frekvencí 20 bodů za sekundu. Byl užit Low pass filtr 1 Hz pro filtraci šumu. Bylo ověřeno, že 1 Hz filtr nemá výrazný vliv na ztrátu dat (ztráta pod 1%).

Pro testování LED detekce odvislé od vyvíjeného miniaturizovaného systému, které by mohlo zanášet další chyby na testování aplikovatelnosti testovaných UV LED a i zvýšení citlivosti detekce bylo testováno spojení LED zdroje OPTAN280J (280 nm) a fotodiody TOCON_ABC2 popisované v předchozích případech ve spojení s citlivou nanolitrovou Micro HPLC Z-celou (Knauer, Německo), s udávanou efektivní délkou 8 mm, objemem cely 140 nL.

Pro nástřik vzorku (400 nL) a eluci gradientu byla využita sestava Iontového chromatografu Dionex Ion Chromatograph DX 200 (Dionex, USA). Separace probíhala v módu iontové chromatografie. Jako kolona byla užitá CS17, 25 cm x 400 μm i.d. (Diones, USA). Jako modelové analyty byly pro tuto separaci použity: L-DOPA (0,08 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), octopamine (0,13 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) sinephrine (0,12 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), phenylephrine (0,12 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a 5-hydroxytryptophan (0,09 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Všechny chemikálie obdrženy od Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Průtok byl 8 $\mu\text{L}/\text{min}$. Byl užit lineární gradient od 15 do 25 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ methansulfonové kyseliny v 0 až 6 minutách a poté držena konstantní koncentrace methansulfonové kyseliny na 25 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Sběr dat byl proveden stejným způsobem jako v předchozím případě pomocí eDAQ e-Corder 401. LED byla napájena 2 mA, při vyšším proudu již došlo k saturaci signálu fotodiody. Schéma zapojení LED, fotodiody a Z-cely je na posteru přiloženého a vážícího se k této kapitole umístěné v kapitole 11.

Poslední testovanou variantou bylo provedení tandemových technik – spojení více typů dotekce v rámci jedné analýzy. V tomto případě bylo testováno spojení optické a elektrochemické detekce, kdy za LED detektor, popisovaný na začátku této kapitoly, kterým procházela kapilára, byl na konci kapiláry zařazen elektrochemický detektor. Jako elektrochemická ceta byla použita komerčně dodávaná ceta FC2 ve wall-jet uspořádání (BVT technologies, Česká republika). Kapilára byla fixována do této cely tak, že výtok kapaliny z kapiláry směřoval na komerčně dodávanou destičku s natištěnými elektrodami AC1.W2.R1 (BVT Technologies, Česká republika). Pracovní elektroda, na kterou proudila kapalina z kapiláry) byla tvořena platinou a referenční elektroda byla tvořena směsí stříbro–chlorid stříbrný. Měření probíhalo v amperometrickém módu, kdy na pracovní elektrodu bylo

přiváděno konstantní napětí a byly odečítány změny proudu. Schéma zapojení zobrazuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Spojení optického (vlevo) a elektrochemického (vpravo) detektoru-

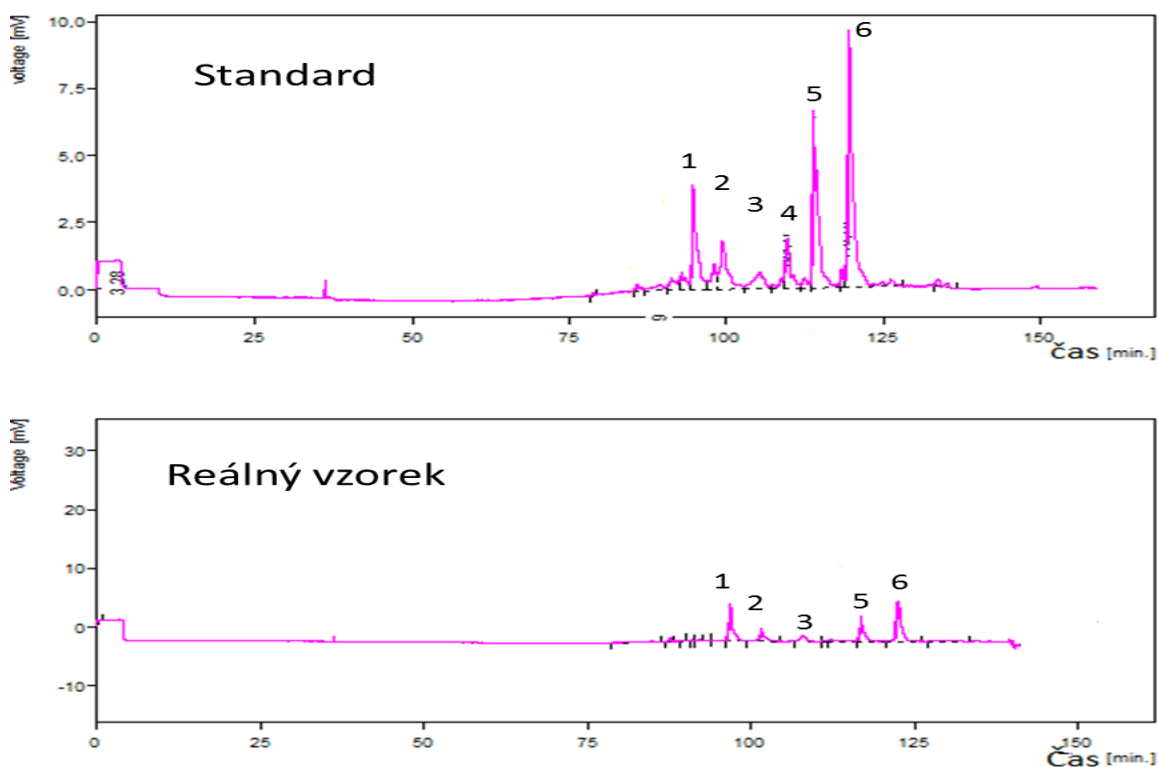
Multidetekční systém byl testován ve dvou módech – jako detekce v módu FIA (průtoková vstřikovací analýza) a v módu izokratické separace na koloně. K oběma módům byla užita modulární platforma popisovaná v kapitole 4.3. Ve FIA módu byla užita za nástřikovým ventilem (4 nL) kapilára s vnitřním průměrem 100 μm a délce 15 cm. Jako eluent byl použit 50mmol.dm⁻³ octan amonný nastavený na pH 5. Průtok činil 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Byl nástřikován 1,1mmol.dm⁻³ methylparaben rozpuštěný ve směsi 33% acetonitrilu ve vodě. Na pracovní elektrodu bylo vloženo napětí +500 mV. V optickém detektoru byl použitý zdroj světla LED OPTAN255H, napájena 10 mA a signál snímán fotodiodou TOCON_ABC2. Elektrochemická celá i sběr dat z obou detektorů byl realizován použitím řídicí a kontrolní elektrochemické stanice Potentiostat E466 (eDAQ, Sydney, SY, Austrálie) a záznam dat prováděn pomocí software eChart (eDAQ, Sydney, SY, Austrálie). V módu izokratické separace byla do systému zapojena monolitická kolona o délce 200 mm a vnitřním průměru 0.1 mm RP-C18 CapRod monolithic column (Merck, Austrálie). Modelová směs obsahovala 2mmol.dm⁻³ dichroman draselný a 0.2mmol.dm⁻³ Orange G ve vodném roztoku. Nástřik činil 4 nL. Mobilní faze byla tvořena 50 % metanolu s 50 % 50mM octanu amonného o pH 4,75. Průtok byl 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. V tomto případě byla užita 470 nm LED OVLGB0C6B9 (Optek technology, USA). Na pracovní elektrodu v elektrochemické cele, stejná jako v předchozím případě, bylo vloženo záporné napětí -100 mV. Ovládání elektrochemické cely a sběr dat byl realizován stejným způsobem jako u FIA módu. Každý nástřik byl 6 krát opakován.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Využití kapilární elektroforézy při analýze kaseinových frakcí

Byly optimalizovány a validovány podmínky elektroforetické separace (složení elektrolytů, pufrů a volba separačního systému) při analýze kaseinových frakcí.

Obrázek 10 ukazuje vzorový elektroforeogram směsi standardů s identifikací jednotlivých píků představující genetické varianty kaseinových frakcí. Pro porovnání je znázorněn i elektroforeogram reálného vzorku.



Obrázek 10: Příklad elektroforeogramu roztoku standardů (nahore) a reálného vzorku kravského mléka (dole). Směsný standard frakcí kaseinů 4 mg/mL každé frakce. Identifikace píků : 1 = α_{S1} , 2 = α_{S0} , 3 = κ , 4 = β_B , 5 = β_{A1} , 6 = β_{A2}

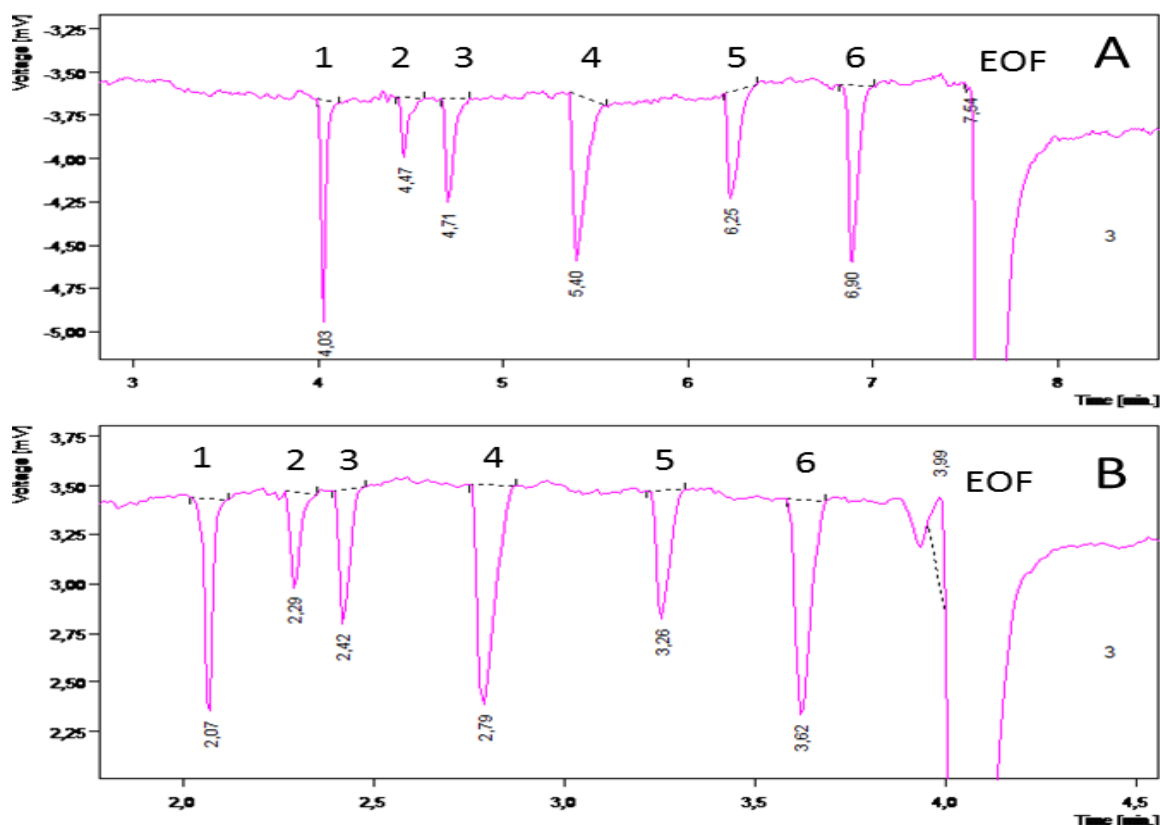
Všech 6 frakcí mělo dostatečné rozlišení (nad 1,0 mezi nejbližšími píky κ a β_B). Opakovatelnost analýz z hlediska migračních časů a ploch píků se pohybovala do 3 % RSD. V této práci se poprvé podařilo řádně rozseparovat všech 6 těchto frakcí oproti publikacím uvedeným v literárním přehledu. Separace s takto dobrým rozlišením nebyla dosud

v literatuře popsána. Bylo dosaženo lepších výsledků rozlišení zejména pro beta frakce, než popisuje práce [37]. Tito autoři popisují separaci 7 frakcí kaseinů s dobou analýzy do 40 minut, ale s ne úplně rozlišenou frakcí β_{A3} . Metoda popisovaná v této dizertační práci popisuje separaci s dobou analýzy do 125 minut, ale s úplným rozlišením všech základních frakcí kaseinů.

Pro běžnou praxi je metoda dostačující pro zjištění všech separovaných frakcí při použití zařízení umožňující kontinuální dávkování vzorků bez nutnosti obsluhy.

5.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Dle převzaté metodiky [64] bylo optimalizováno místo nástřiku. Standardně užívaný nástřik vzorku do kapiláry na vstupní (inletové) straně (vzdálenější strana od detektoru, efektivní délka byla 50 cm) byl otestován a separace analytů vykazovala úplné rozlišení všech píků. Proto byla vyzkoušena i separace na krátké dráze. Tato strana (nazývaná outletová) byla 25 cm dlouhá a jedná se o kratší stranu umístěnou za detektorem. Pro užití této strany byla obrácena polarita vloženého napětí, jinak byly všechny podmínky zachovány. Rozlišení dvou nejbližše migrujících píků bylo úplné (nad 1,2) a doba analýzy se zkrátila na polovinu (z 8 minut na 4). Oproti separaci na inletové straně zde nebylo možno temperovat prostor jako u inletového prostoru a separace probíhala za laboratorní teploty. Nemělo to však vliv na opakovatelnost analýz. Protékající proud činil 5,5 μA , tak že nedocházelo k výraznému uvolňování Jouleova tepla a nebyl problém s lokálním přehříváním vzorku rozpuštěného ve vodném prostředí. Bylo tak možno využít zaostřovacího (stacking) efektu pro zakoncentrování zón analytu. Pro všechny analýzy tak byly voleny podmínky nástřiku na krátké straně. Porovnání separace na outletové (krátké) a inletové (dlouhé) straně znázorňuje Obrázek 11.

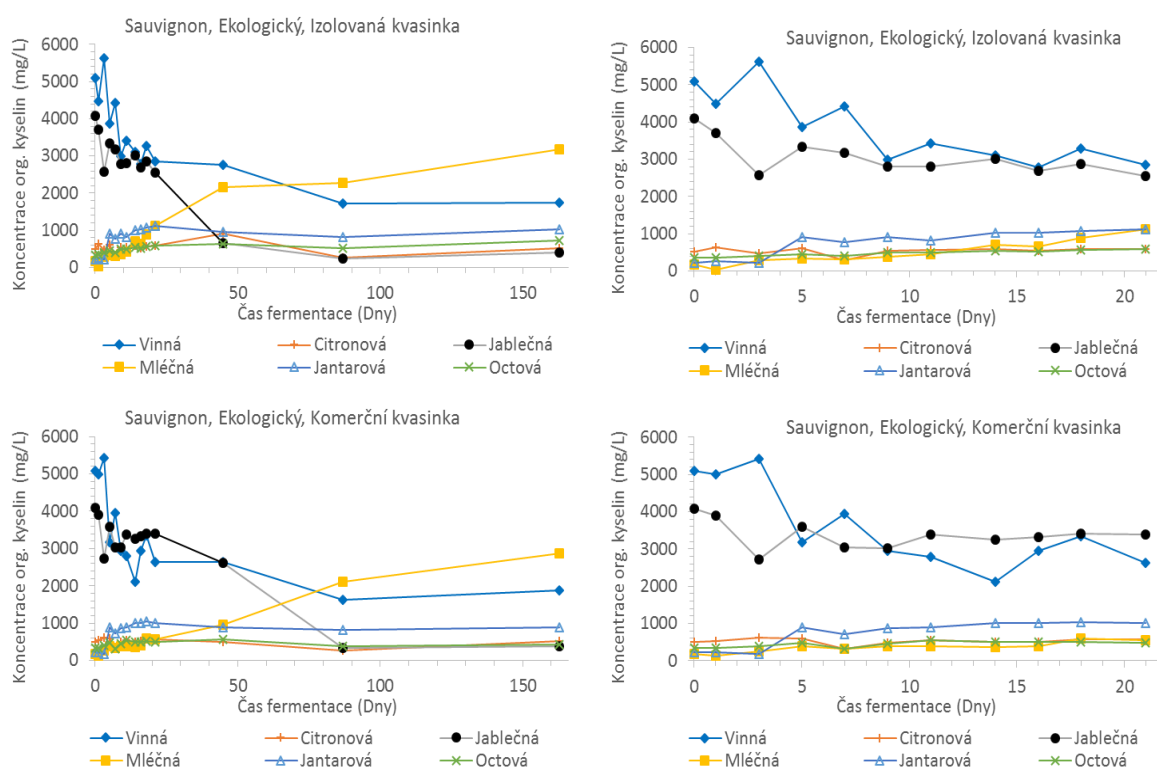


Obrázek 11: Porovnání dávkování na odlišných stranách kapiláry. A: Záznam dávkování na inletové straně (efektivní délka 50 cm). B: dávkování na outletové straně (efektivní délka 25 cm). Směs standardů organických kyselin – identifikace píků: 1.vinná, 2.citronová, 3.jablečná, 4.mléčná, 5.jantarová, 6.octová, EOF elektroosmotický tok. Ostatní podmínky viz. Experimentální část. Na ose y zachycen signál změn absorbance (1 mV = 1 mAU).

Byla ověřena reprodukovatelnost analýz opakovaným nástřikem směsného standardu ($n=6$). Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků a migračních časů byla pod 3%. Linearita metody byla ověřena proměřením kalibrační závislosti směsného standardu v rozsahu 10 až 1000 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ každého analytu. Pro každý analyt byla zvlášť vyhodnocena závislost a vyhodnocena metodou lineární regrese. Koeficient lineární regrese se pro všechny analyty v kalibračním rozsahu pohyboval nad 0,995. Šum signálu byl vyhodnocen z časového úseku 3 minut, jako rozdíl maximální a minimální hodnoty signálu a činil $1 \cdot 10^{-5}$ absorbanční jednotky (AU). Jako trojnásobek hodnoty šumu byl vypočítán limit detekce, který činil 5 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro všechny analyty. Limit kvantifikace byl spočítán jako trojnásobek limitu detekce, což činilo 15 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro stanovované analyty. Metodou standardního přidavku byla ověřena výtěžnost, která byla kolem 90%, takže matriční vlivy byly minimální. Byla tak pro vyhodnocení použita vodná kalibrační závislost, kdy standardy byly rozpuštěny ve vodě.

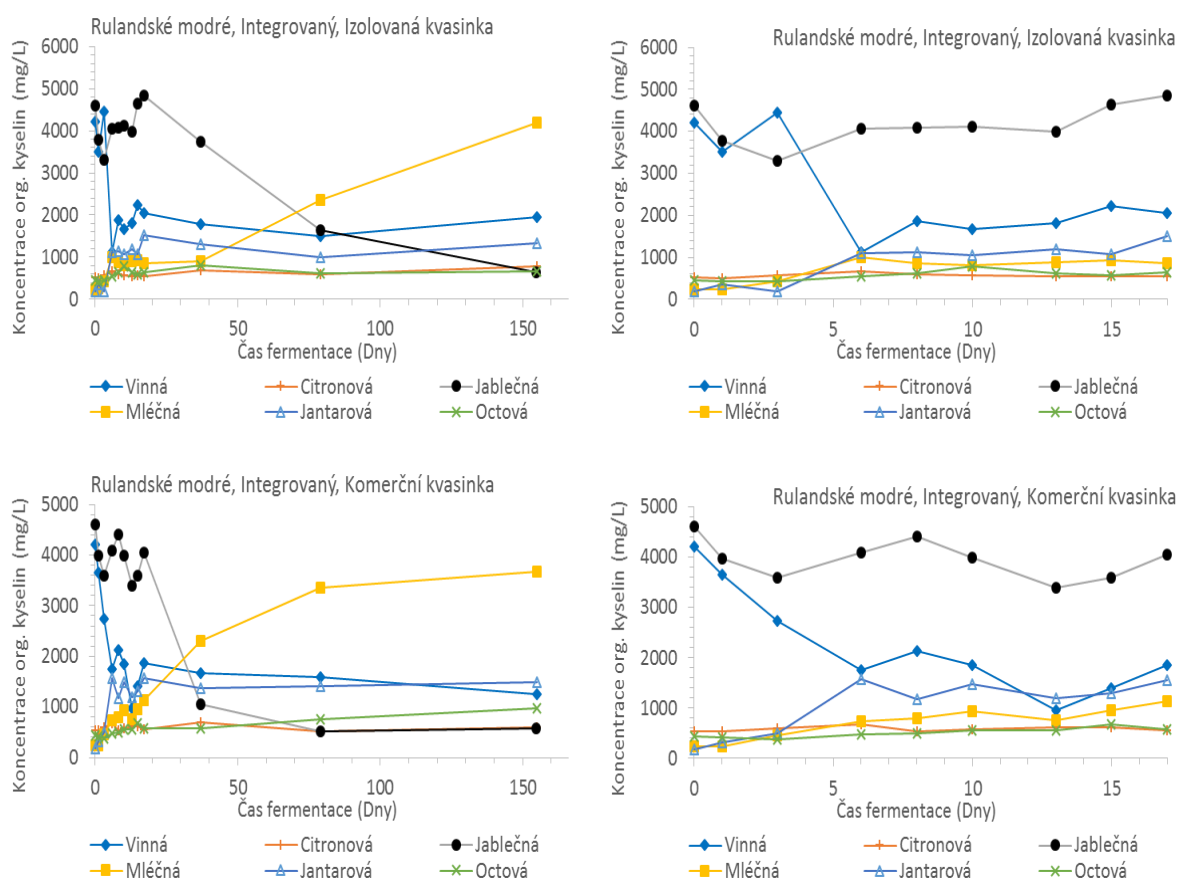
Optimalizovaná metoda byla aplikována na analýzu série vzorků fermentovaného moštu v různých stádiích prokvašení. Prvních 10 odběrů byly vzorky odebírány každé 2 dny pro dostatečné pokrytí počátku fermentačního procesu a závěrečné odběry byly udělány s odstupem měsíce a po dalších třech měsících pro určení fermentačních změn až do úplného konce kvasného procesu před stáčením vína. Ve všech vzorcích byl stanoven obsah organických kyselin a vyhodnoceno jejich odbourávání nebo vytváření.

Po polovině doby kvašení se u všech vzorků projevilo jablečno-mléčné kvašení, což souhlasí s předpoklady uvedené v úvodu do problematiky. Došlo zde k rozvoji autochtonních bakterií mléčného kvašení. Kyselina jablečná byla spotřebovávána a vytvářela se kyselina mléčná. Výraznější projev tohoto kvašení byl u červených vín. V průběhu celého hlavního kvašení docházelo k odbourávání kyseliny vinné, což souhlasí s poznatkami, že tato kyselina je substrátem pro činnost kvasinek. Mírný nárůst v počáteční fázi a následně udržování koncentrace bez výraznějších změn vykazovaly kyseliny octová, citronová a jantarová. Neměnnost obsahu těchto kyselin prokazuje, že nedocházelo k octovému kvašení ani jiným vadám vína. Průběhy fermentace znázorňují obrázky 12 až 14.



Obrázek 12: Grafy změn koncentrací stanovovaných organických kyselin v různém čase fermentace pro mošty z odrůdy Sauvignon, produkovaný z ekologické agrotechniky a fermentovaný komerčním druhem kvasinky a autochtonní kvasinkou izolovanou z vinohradů. Čas fermentace 0 odpovídá koncentraci kyselin v moštu z bobulí bez zaočkované kvasinky. Pro lepší rozlišení průběhu v počátku i a celé fermentace je uveden průběh celé fermentace (grafy nalevo) a fermentace v prvních 22 hodinách (grafy napravo).

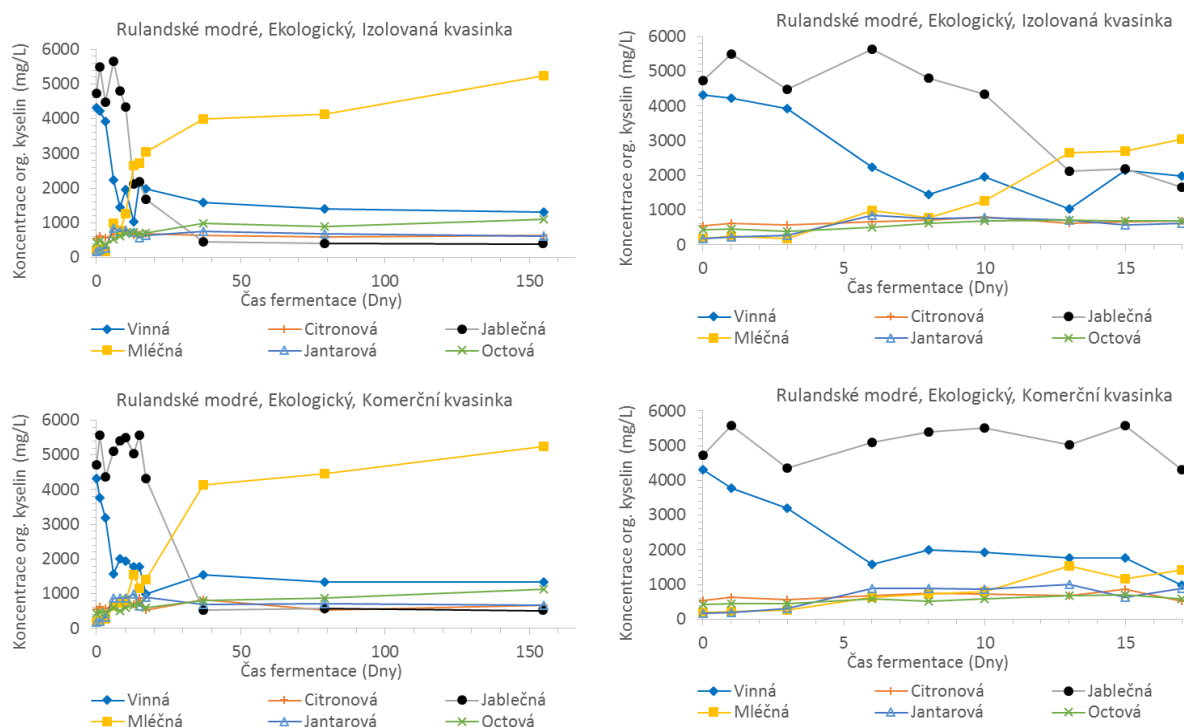
V odrůdě Sauvignon, která byla testována na moštu pouze z ekologické produkce je možno vidět porovnání fermentace dvěma různými druhy kvasinek. Jak znázorňuje Obrázek 12 významnější rozdíly jsou pouze v rychlosti odbourání kyseliny jablečné, za což ale nejsou zodpovědné vinařské kvasinky. Rychlejší odbourání kyseliny jablečné je u moštu fermentovaného izolovanou kvasinkou. V principu by činnost a vlastnosti této kvasinky mohla mít vliv na dřívější rozvoj mléčných bakterií, protože každý kmen uvolňuje řadu různých látek ovlivňující diverzitu mikrobioty (např. produkce killerových toxinů) v důsledku soutěžení o živiny k růstu [43]. Koncentrační profil ostatních kyselin je shodný.



Obrázek 13: Grafy změn koncentrací stanovovaných organických kyselin v různém čase fermentace pro mošty z odrůdy Rulandské modré, produkovaný z integrované agrotechniky a fermentovaný komerčním druhem kvasinky a autochtonní kvasinkou izolovanou z vinohradů. Čas fermentace 0 odpovídá koncentraci kyselin v moštu z bobulí bez zaočkované kvasinky. Pro lepší rozlišení průběhu v počátku i a celé fermentace je uveden průběh celé fermentace (grafy nalevo) a fermentace v prvních 17 hodinách (grafy napravo).

U odrůdy Rulandské modré u produkce z integrovaného ošetřování vinohradu (Obrázek 13) byla pro jablečno-mléčné kvašení opačná situace než u Sauvignonu. U fermentace izolovanou kvasinkou docházelo k odbourání kyseliny jablečné pozvolněji než komerční kvasinkou. Rychlejší bylo odbourání kyseliny vinné, kdy k razantnímu snížení jejího obsahu došlo v prvních dnech. V profilu odbourání kyseliny vinné nebyly mezi druhy

kvasinek rozdíly. Kyselina octová, jantarová a citronová nevykazovaly výrazné změny koncentrací.



Obrázek 14: Grafy změn koncentrací stanovovaných organických kyselin v různém čase fermentace pro mošty z odrůdy Rulandské modré, produkovaný z ekologické agrotechniky a fermentovaný komerčním druhem kvasinky a autochtonní kvasinkou izolovanou z vinohradů. Čas fermentace 0 odpovídá koncentraci kyselin v moštu z bobulí bez zaočkování kvasinky. Pro lepší rozlišení průběhu v počátku i a celé fermentace je uveden průběh celé fermentace (grafy nalevo) a fermentace v prvních 17 hodinách (grafy napravo).

Mošt z odrůdy Rulandské modré vyprodukovaný ekologickou agrotechnikou vykazoval podobný profil kyselin jako u techniky integrované. Jablečno-mléčné kvašení probíhalo u obou druhů kvasinek obdobně a k odbourání kyseliny jablečné došlo s podobnou rychlostí. Odbourání kyseliny vinné proběhlo také v prvních pár dnech kvašení. Výsledné koncentrace kyseliny mléčné byly obdobné pro všechny testované červené odrůdy. Profil kyselin u užitých komerčních kvasinek nevykazoval závislost na druhu agrotechniky. U izolované formy kvasinky se lišil jen v průběhu odbourání jablečné kyseliny.

Výraznější změny profilu kyselin u červené odrůdy Rulandské modré byly oproti bílé odrůdě Sauvignon. Rozdíly byly znatelné zejména u rychlosti odbourání kyseliny vinné, kdy u červené odrůdy bylo toto odbourání rychlejší. Z hlediska jablečno-mléčné fermentace docházelo u červených vín k razantnějšímu poklesu kyseliny jablečné a celkově vyšší koncentraci výsledné kyseliny mléčné na konci kvasného procesu. U kyselin octové, citronové

a jantarové nedocházelo k výrazným změnám ani rozdílům mezi kvašenými odrůdami moštů ani mezi rozdílnými druhy kvasinek. Vliv užití agrotechniky na profilaci organických kyselin neměl přímo větší vliv. Je možné, že některé složky postřiků mohly částečně ovlivnit diverzitu a chování mikroflóry a to se sekundárně mohla projevit různým profilem jablečno-mléčné fermentace a rychlostí odbourání kyseliny vinné.

Vliv na různý profil kyselin při kvašení mohly mít jednak rozdílná diverzita mikroflóry u červené a bílé odrůdy a odlišné chování mikroflóry způsobené rozdílným složením složek moštu. Červené víno obsahuje značně více polyfenolických látek, které zcela mění charakter vína, jiná byla i cukernatost a částečně jiné mohly být i teplotní podmínky dané rychlostí prokvašení. Vliv těchto parametrů nebyl studován z důvodu rozsáhlosti nutné práce a nebylo to primárním cílem této práce. Zde šlo o základní průzkum sledování výrazných změn v zastoupení organických kyselin.

Byla úspěšně optimalizována kapilárně elektroforetická metoda pro analýzu průběhu fermentací různých druhů moštu v uspořádání kapilární zónové elektroforézy. Byl proměřen dostatečný počet odběrů pro posouzení celého průběhu fermentace a shrnuty pozorované poznatky. Vliv agrotechniky neměl výrazný vliv na složení organických kyselin a druh zvolených kvasinek částečně vliv díky diverzitě druhu měl. Tato práce může být základem dalšího podrobnějšího zkoumání vlivů jednotlivých parametrů na sledované analyty.

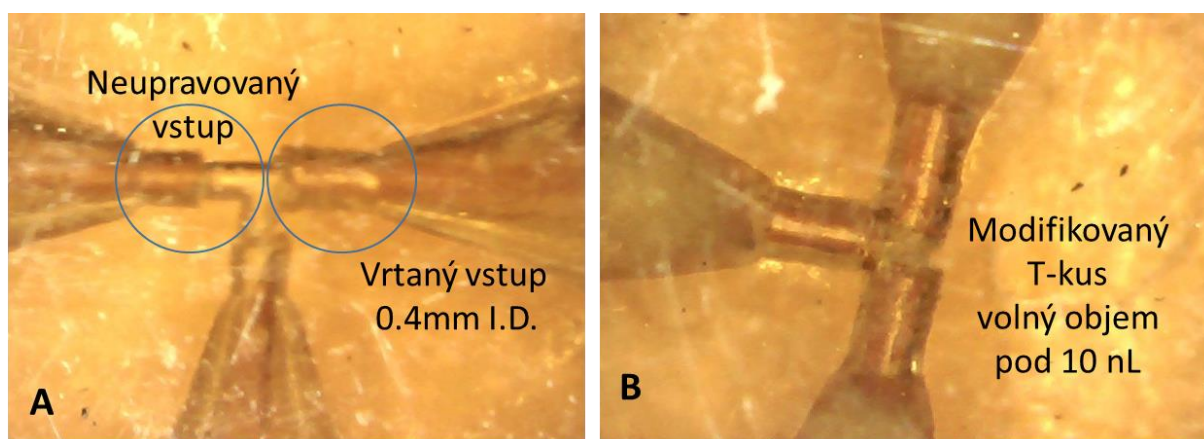
5.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

V této části práce bylo zkompleťováno a otestováno mikrofluidické zařízení použitelné jako miniaturizovaný přenositelný kapalinový chromatograf. Preference byla kladena na užití komerčně dostupných součástí, vzájemně kompatibilních, s minimem nutných laboratorních úprav. Důraz byl dán i na modifikovatelnost systému a kompatibilitu s dalšími součástmi systému nepatřících ke standardní výbavě komerčně dostupných částí. Tato část práce byla opublikována v zahraničním impaktovaném časopise *Analitica Chimica Acta* zaměřeného na nové trendy v oblasti analytické chemie. Zde je také proveden popis systému, potřebná diskuse a jsou zde uvedeny příklady aplikací a různé módy tohoto systému. V této kapitole jsou proto uvedeny jen dodatečné informace a části výzkumu v této publikaci nezahrnuté na celkové dokreslení výstupu této části práce.

Fáze vývoje tohoto výzkumu by se daly rozdělit na 3 podstatné části. V první fázi došlo ke kompletaci a zapojení modulárního systému. Nejdříve byla sestava testována v módu průtokové vstřikovací analýzy. V tomto typu zapojení byly charakterizovány jednotlivé komponenty, jejich charakteristiky a vlastnosti sestavy jako celku pro otestování použitelnosti sestavy jako miniaturizované chromatografické stanice. V tomto zapojení bylo místo chromatografické kolony napojena nepokrytá křemenná kapilára (i.d. 100 μm).

Systém pump a přepínacích ventilů byl propojen ze základní deskou a ovládacími kabely. Obojí bylo napojeno na řídicí jednotku ovládanou počítačem. Ovládání bylo intuitivně řízeno softwarem kompatibilním se systémem LabSmith a volně stažitelným z webových stránek firmy LabSmith.

Při návrhu instrumentálního systému byl kladen důraz na maximální komerční dostupnost všech komponent s minimalizací uživatelských úprav. Jedinou z modifikací komerčně dodaných částí bylo zmenšení volného objemu T-kusu, který spojoval přítok mobilní fáze ze dvou větví. Takto bylo dosaženo volného objemu pod 10 nL, oproti původnímu objemu nad 30 nL. Výrazně se tak zkrátila doba náběhu směsi v případě gradientové eluce a ubylo výkyvů (zvýšování šumu) v průběhu změn využití první a druhé cesty. Vrtaný T-kus zobrazuje Obrázek 15.



Obrázek 15: Fotografie T-spojky použité pro propojení přítoků mobilní fáze A a B s jasně viditelnými úpravami (ručním dovrtáním vrtáním) pro snížení volného objemu v místě míchání mobilních fází. Obrázek A(vlevo) ukazuje na jedné straně nevrtaný vstup, tak jak byl vyroben komerčně a na druhé straně dovrtanou cestu. Obrázek B ukazuje T-spojku doupřravenou vrtáním z obou stran i se zasunutými kapilárami (360 μm O.D.) ze všech tří stran.

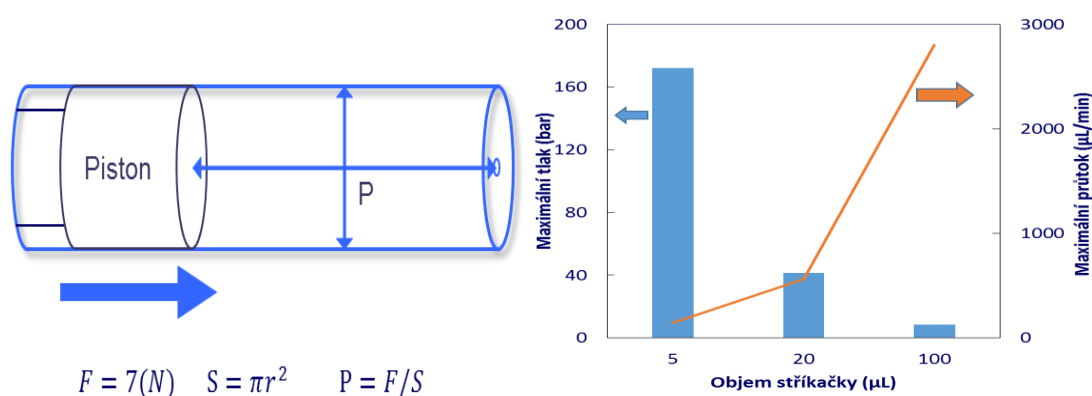
Další částí standardně komerčně nedodávanou byl detekční systém. Jako optický detekční systém byl užitý kapilární detektor z dříve publikované práce [140]. Jako zdroj světla byly využito elektroluminiscenčních diod (LED) zejména pro viditelnou oblast spektra (600, 470 a 355 nm), detaily jsou popsány v příložené publikované práci. Testovány byly i zdroje záření založených na LED pro oblast pod 300 nm. Jejich charakterizace a testování je popsáno jako samostatná kapitola 5.4 této práce. Testován byl i elektrochemický detektor umístěný jako koncový prvek průtokového systému (koncově-kapilární detektor). Ten je popsán rovněž jako část kapitoly 5.4. Detekční systémy byly napojeny bez volných objemů skrze přímou spojku, která byla provrtána 400 μm vrtákem, a kolona (případně dutá kapilára) byla natěsně spojena s kouskem kapiláry procházející detektorem. Tyto kapiláry tak byly spojeny napřímo, dosednutím hran (kapilár nebo kolony) zbroušených brusným papírem na sebe a užitím šroubení pro zafixování pozice kapilár. Toto napojení zajistilo možnost pevnějšího upevnění detektoru bez nutnosti opětovně měnit kapiláru procházející detektorem, případně snadno měnit kolonu. Dosednutí hran na sebe bylo kontrolováno opticky pomocí USB mikroskopu, protože spojka byla dodávána z průhledného materiálu.

V tomto zapojení byla testována sestava a její jednotlivé součásti. Pro zkoušení vlastností byla v sestavě zařazena namísto monolitické kapilární kolony křemenná dutá kapilára a systém byl provozován jako průtoková vstřikovací analyzátor. Díky začleněnému tlakovému senzoru (LabSmith, USA) bylo možno vyhodnocovat i údaje o tlaku v systému. Na konci byl umístěn průtokový sensor (IDEX, USA) pro objemy v nanolitrových řádech, který

zaznamenával změny rozdílu průtoků. Ten podával informace o pulzování pump a stabilitě průtoku.

Protože nebyly dostupné informace o maximálním provozním tlaku, které tyto pumpy mohou vyvinout, ani bližší údaje o pumpách, byla jedna z pump rozebrána. Bylo zjištěno, že pohonný mechanismus je tvořen krokovým motorem s výsuvným rotorem, na který se pomocí závitu připevňuje píst jdoucí do stříkačky. Z údajů na krokovém motoru bylo možné dohledat v technických specifikacích výrobce krokových motorů (Haydon Linear Motors Co., Ltd., Čína), že maximální síla kterou je schopen tento typ motoru vyvinout je 7 Newtonů. Na základě změření vnitřních průměrů jednotlivých stříkaček, ve kterých se posouvá píst a nezávisle i z měření objemů a délek vodního sloupce ve stříkačkách byl skrze Pascalův zákon z plochy a maximální síly (7 N) kalkulován maximální tlak, který jsou pumpy schopny vyvinout pro jednotlivé velikosti pístů. Situaci a výpočet zobrazuje Obrázek 16.

Vzhledem k tomu že krokový motor vysouval píst v určitých jemných skocích (krocích), které bylo možno také vyčíst z technických specifikací, byly kalkulovány objemy, které motor vytlačil za jeden krok motoru. Tato informace je užitečná pro úvahy s jakým nejmenším rozlišením (dané krokem motoru) a tím vytlačeným objemem jsou pumpy schopné pracovat. Plyne z toho, že největší narušení plynulosti toku a chyby přesnosti vytláčené kapaliny budou při nejnižších nastavených průtocích. Mírně se lišily i technické specifikace týkající se možných nastavitelných hodnot průtoků a objemů stříkaček a skutečné hodnoty nastavitelné softwarem. Diskutované údaje ukazuje Tabulka 2.



Obrázek 16: Schéma výpočtu maximálního tlaku pump (vlevo). Graf kalkulovaných hodnot maximálního tlaku pro různé objemy pístů (5, 10 a 100 µL) (uprostřed). V grafu jsou na vedlejší ose znázorněny i maximální softwarem dovolené limity pro nastavení průtoků.

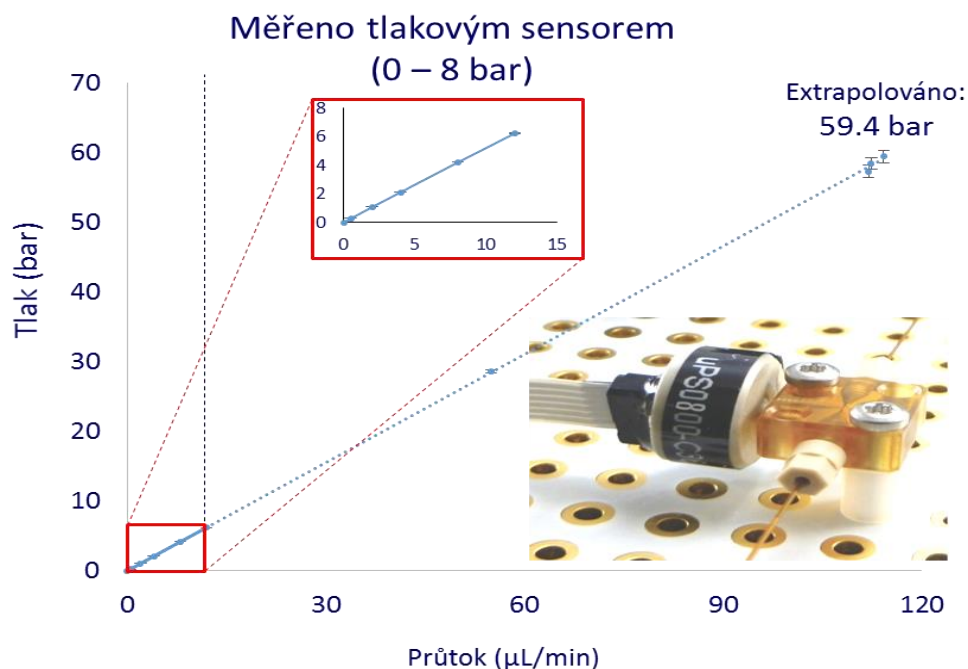
Tabulka 2: Uvedené nastavitelné hodnoty dle technických specifikací a skutečné hodnoty nastavitelné v ovládacím software (v závorkách) pro jednotlivé rozměry stříkaček (tabulka vlevo). Kalkulované hodnoty velikosti objemu jednotlivého kroku krokového motoru pro jednotlivé velikosti stříkaček (tabulka vpravo).

Stříkačkové pumpy: Technické specifikace vs. (rozsahy akceptované softwarem)			
F [ul/min]	V _{stříkačky} [ul]	Objem stříkačky (μL)	Velikost kroku (μL)
1.0 – 5600 (0.073 – 2800)	80 (0-100)	5	0.008
0.5 – 2800 (0.036 – 1410)	40 (0-50)	20	0.033
0.2 – 1100 (0.0145 – 560)	20 (0-20)	80	0.170
0.10 – 560 (0.0073 – 280)	8 (0-10)		
0.05 – 280 (0.0036 – 141)	4 (0-5)		

Tlakové limity a charakterizace pump byla ověřována i experimentálně, pomocí tlakového sensoru umístěného v systému. Pro testování byly zvoleny 5 μL a 20 μL stříkačky, které byly předpokládány pro použití na systémy s chromatografickou kolonou, vzhledem k nejvýše dosažitelným tlakům a nejmenším fluktuacím během dodávání kapaliny. Systém byl charakterizován za podmínek pumpování vody a metanolu. Jako simulace odporu namísto kolony sloužila dutá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm a délce 50 cm. Pumpování probíhalo při teplotě 17,4°C a měření bylo 6 krát opakováno. Měření naráželo na tlakové limity tlakového sensoru (do 800 kPa). Tato hodnota byla pro měření limitující a tlaky pro větší průtoky byly extrapolovány, jak zobrazuje Obrázek 17 a výsledky pro 5 μL a 20 μL stříkačky shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Extrapolované hodnoty tlaků při maximálním průtoku pro vybrané stříkačky pro dvě různá vodná prostředí.

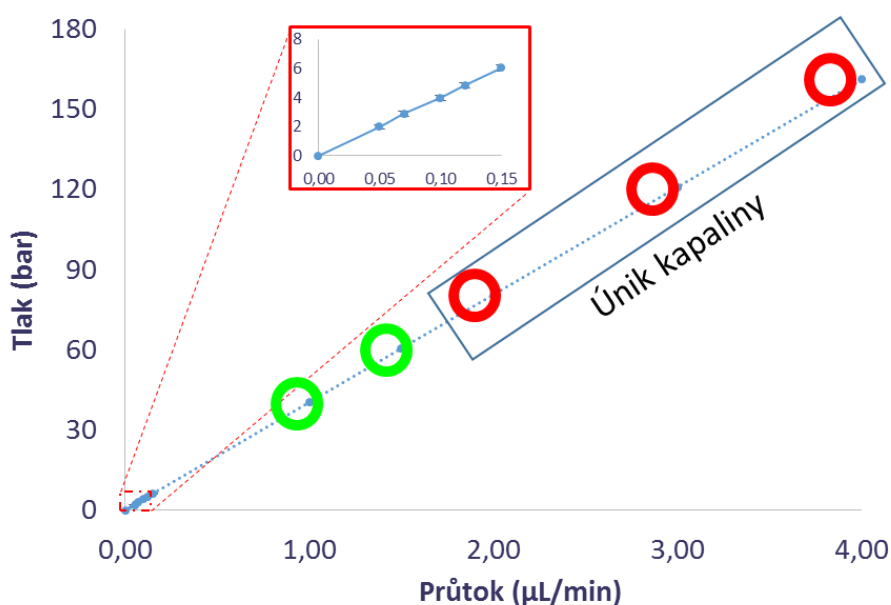
	Maximální průtok (μL/min)	Tlak (bar) při maximálním průtoku	
		Voda	Metanol
Stříkačka 5μL	116 (%RSD=2)	59.4	40.7
Stříkačka 20μL	96 (%RSD=1)	53.5	36.3



Obrázek 17: Experimentální ověření tlaku v závislosti na průtoku. Měření pomocí začleněného tlakového senzoru.

Během experimentu bylo také ověřováno, zda nedochází k únikům kapaliny kolem jednotlivých částí systému, měřením objemu vytlačené kapaliny.

U systému při vyšších průtocích docházelo k únikům kapaliny. Graf závislosti tlaku a průtoku s vyznačenými úniky kapaliny ukazuje Obrázek 18.



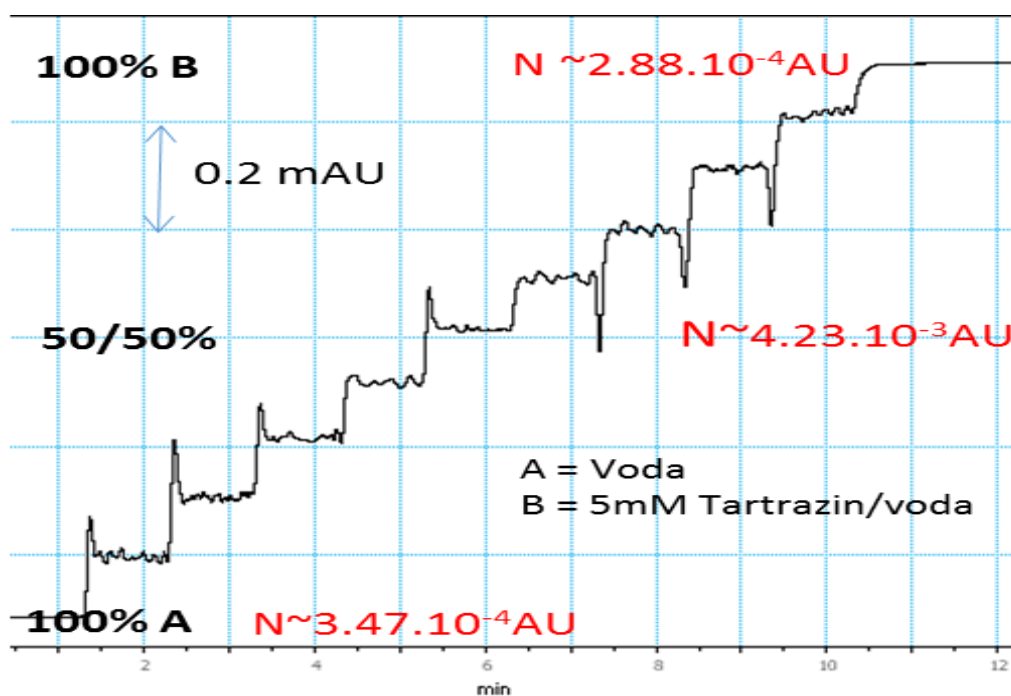
Obrázek 18: Graf závislosti tlaku na průtoku pro 5 μL stříkačku, pumpovaná kapalina: voda, teplota 17,4°C, jako odpor byla použita dutá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm a délce 50 cm a na ni napojena kapilára o vnitřním průměru 25 μm a délce 200 cm. Každý průtok byl měřen 6 krát.

Maximální tlak pro průtok, kdy ještě nedocházelo k úniku kapaliny pro 5 μL stříkačku, byl 60,4 bar. Nad tento průtok (tlak) bylo zaznamenáno nižší množství vytlačené kapaliny, než byla nastaveno, takže logicky začalo docházet k úniku kapaliny kolem pístu, nebo do přepínacího ventilu. Tlak 6000 kPa (60,4 bar) byl dostačující a i průtok kolem 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ byl vzhledem k průměrům kapilár a kolon které dosahovaly maximálně 100 μm dostatečný i pro rychlé analýzy. Tlakové limity a průtoky se samozřejmě lišily dle užití stříkačky a podmínek měření. Ukázán byl tento případ jako nejpoužívanější varianty stříkaček schopných vyvinout nejvyšší tlak. Blíže je tato problematika průtoků a tlaků diskutována v přiložené publikaci.

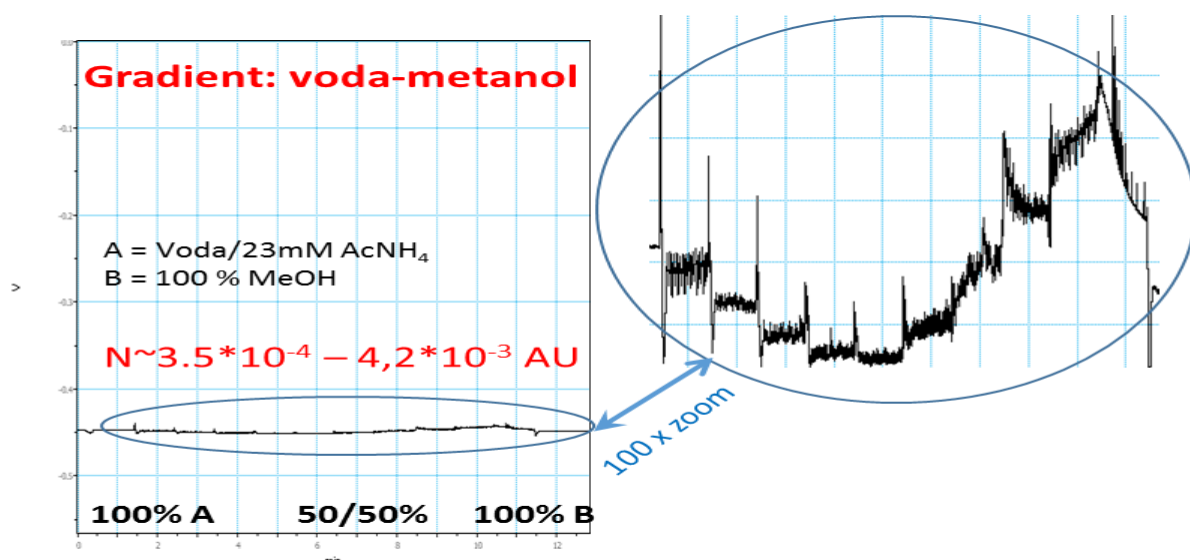
V módu průtokové vstřikovací analýzy bylo testováno i chování systému na vyvíjení izokratické a gradientové eluce. Izokratická eluce byla řešena pumpováním pouze jedné mobilní fáze dvěma stříkačkami – jedna vytlačovala kapalinu do systému a druhá načerpávala mobilní fázi a následně došlo k přepnutí přepínacího ventilu a obrácení chodu pístu. Chod pístu tak v podstatě napodoboval chod pumpy s přepínacími ventilkou a písty u konvenčních chromatografických stanic. Při správném načasování a spuštění vytlačování kapaliny před změnou polohy přepínacího ventilu se minimalizoval ráz (viditelný trhnutím základní linie na záznamu) na hodnotu běžného šumu. Pro izokratické eluce bylo vhodné užít 20 μL stříkačky pro jejich delší výdrž mezi přepnutím ventilu (až 20 min při průtoku 1 $\mu\text{L}/\text{min}$), takže zvýšení šumu na záznamu bylo ještě minimalizováno. Tato velikost stříkaček byla vhodným kompromisem mezi potřebným tlakem, výdržností (kapacity stříkačky) a chybavostí stříkaček při nízkých průtocích (vykazovaly nižší šum než 100 μL stříkačky v průběhu chodu pístu).

V módu gradientové eluce byla situace složitější o nutnost nastavit časovou synchronizaci průtoků a přepínání jednotlivých pump. Gradient byl vytvářen postupným zvyšováním průtoku pumpy čerpající mobilní fázi B (organická fáze např. methanol) a postupným snižováním průtoku pumpy dodávající mobilní fázi A (vodná fáze, např. octan amonný). K tomu ještě bylo třeba zauvažovat správné načasování přepnutí mezi pumpami vytlačujícími kapalinu do systému a nasávající kapalinu z rezervoáru a opět minimalizovat tlakové rázy vzniklé rozběhem pump a přepínáním přepínacího ventilu spuštěním vytlačení před přepnutím ventilu. Mobilní fáze A a B byly míchány v T-spojce s minimálním volným objemem a následovalo propojení nejkratším možným kouskem kapiláry (50 μm vnitřní průměr, 4 cm délka) se vstřikovacím ventilem. Krátký kus a průměr byl volen pro minimalizaci časové prodlevy změny koncentrací mobilní fáze A a B a průměr kapiláry byl volen s ohledem

na nenáročnost zvýšení tlaku v systému, které při 50 μm vnitřního průměru bylo ještě přijatelné. Pro vizualizaci testování gradientové eluce byla jako mobilní fáze A použita voda a jako mobilní fáze B byl použit 5mmol.dm⁻³ roztok tartrazinu. Detekce probíhala při 470 nm. Systém byl bez chromatografické kolony, takže s minimálním odporem systému pro zachycení chování pump bez zátěže. Testování systému se zátěží (s kolonou) probíhalo za pomoci 23mmol.dm⁻³ roztoku octanu amonného (A) a metanolu (B). Obě situace znázorňuje Obrázek 19 a Obrázek 20.



Obrázek 19: Vizualizace gradientové eluce za použití vodného roztoku tartrazinu (5mmol.dm⁻³) jako mobilní fáze B a vody jako mobilní fáze A. Generování gradientu začíná od 100% A do 100% B. V záznamu je uvedena i hodnota šumu (N) v absorbančních jednotkách. Systém byl testován ve FIA módu bez kolony za použití 5 μL stříkaček, průtok (A+B) byl 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a použity byly 100 μm kapiláry. Detekce probíhala při 470 nm LED absorbančním detektorem.



Obrázek 20: Záznam gradientové eluce za použití vodného roztoku octanu amonného ($23\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) jako mobilní fáze A a 100% methanolu jako mobilní fáze B. Generování gradientu začíná od 100% A do 100% B. V záznamu je uvedena i hodnota šumu (N) v absorbančních jednotkách. Systém byl testován ve FIA módu bez kolony za použití $5\mu\text{L}$ stříkaček, průtok (A+B) byl $0,5\mu\text{L}/\text{min}$ a použity byly $100\mu\text{m}$ kapiláry. Detekce probíhala při 470 nm LED absorbančním detektorem. Na detailu vpravo je 100x zvětšený detail základní linie.

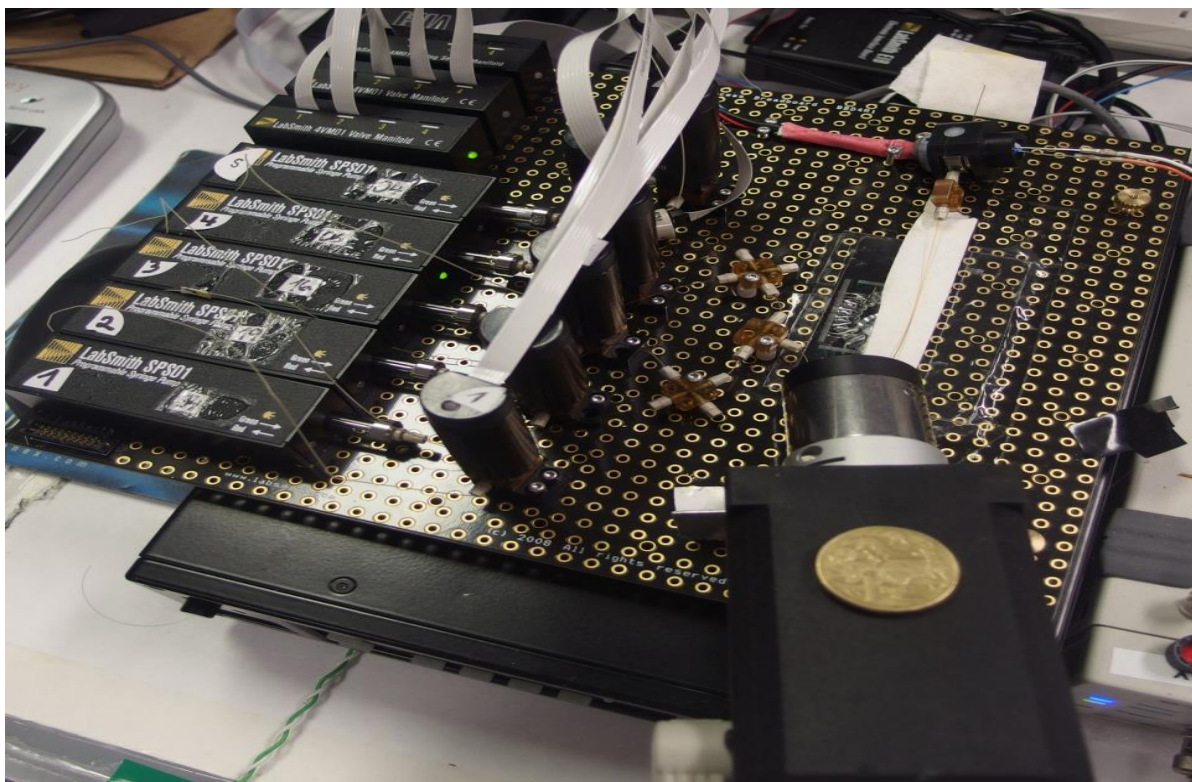
Na obrázcích zachycující průběh gradientové eluce jsou patrné rozdíly v absorbanci při zvyšujícím se poměru roztoku B k A. V každém stupni, který odpovídal příslušnému % A a B byla zaznamenána hodnota šumu. Ta zůstávala stejná po celou dobu, jen s mírným nárůstem v v oblasti kdy pracovaly obě pumpy zároveň stejnou rychlostí. To bylo dáno větší zátěží a možnou asynchronností pump. Nejmenší hodnoty šumu vykazovaly hodnoty v oblasti nevyšších průtoků A nebo B. To korelovalo s pozorováním a předpoklady danými určováním chyb z nejmenšího možného rozlišení kroku motoru. Na obrázcích jsou také patrné „záškuby“ – výraznější píky – na začátku každé změny koncentrace. To bylo dáno právě zvýšením otáček krokového motoru (zvýšení průtoků), které způsobilo tlakový ráz v systému při rozběhu pumpy, případně při zpomalení druhé pumpy. Obojí vyvolalo, v takto volném systému bez odporu, výraznější změny v tlaku a došlo k rychlejšímu pohybu protékající kapaliny, případně jejímu pohybu tam a zpět projevující se zvýšením šumu. Tyto jevy byly minimalizovány, když do systému byl zařazen odpor (kolona). Eliminace tohoto problému a bližší diskuse k tomuto je uvedena v příloženém článku v kapitole 11.3.

Dalším problémem objevující se v chromatografických systémech a také v tomto byl propad základní linie v průběhu generace gradientu při přechodu z vodné fáze do organické. Výrazně to je vidět na detailu ukazující Obrázek 20. Tento propad základní linie, nejvíce patrný v oblasti od 30% organické fáze ve vodě, byl způsoben a zvýrazněn užíváním křemenných

kapilár majících cylindrický profil, na němž docházelo k výraznému rozptylu procházejícího záření. Čtvercové kapiláry nejsou běžně dostupné a vzhledem k těmto dosud užívaným kapilárám v oblasti kapilární elektroforézy, nebyl tento problém při gradientové eluci předpokládán. Tento jev byl způsoben souhrnem několika jevů. Jednak to byly změny v indexu lomu v průběhu změn koncentrací organické fáze ve vodě. To bylo nezávisle potvrzeno měřeními separátních vzorků různé koncentrace organické fáze ve vodě v kyvetách čtvercového profilu. Dále to byly Schlierovy efekty, které vznikají při mísení organické fáze s vodou a projevují se zejména změnou indexu lomu zejména nad 30% organické fáze ve vodě. Minoritní efekt na stabilitu základní linie mělo i pulsování pump. Problém poklesu základní linie byl zaznamenán i u komerčně dodávané chromatografické stanice s kapilární detekcí (Agilent, Germany). Mnohé společnosti tento problém řeší prostým odečtením pozadí základní linie. Velký problém to není v případě opakovatelnosti průběhu základní linie, a pokud se stanovované píky nenachází na nejstrmější části propadu základní linie. V případě opakovatelnosti ploch a retenčních časů píků se relativní směrodatná odchylka pohybovala do 3% (n=6).

Příklady aplikací a opakovatelnosti analýz a další informace o stabilitě základní linie jsou v příloženém článku v kapitole 11.3.

Na rozdíl od předchozích publikací uvedených v úvodu této práce došlo k poskládání komerčně dostupného miniaturizovaného, modulárního a přenositelného střednětlakého chromatografického systému. Tlak vyvinutý pumpami dostačoval na běžné analýzy a byl dostatečný na protlačení kapaliny monolitickou kapilární kolonou v rozsahu, kdy nedocházelo k únikům kapaliny v důsledku vysokých tlaků. Celková opakovatelnost pro analýzy v gradientovém módu se pohybovala do 5% RSD, což korelovalo s jinými pracemi [143]. Horší hodnoty opakovatelnosti jsou cenou za ztrátu robustnosti a ceny komerčně dodávaných stolních přístrojů. Byl prokázán potenciál užití této sestavy na analýzy na místě s výhodou poskytnutí okamžitého výsledku, např. pro odhalení falšování potravin, nebo odhalení zdravotního nebezpečí na místě. Širší aplikace přesahovaly rámec této práce a jsou předmětem dalšího výzkumu.

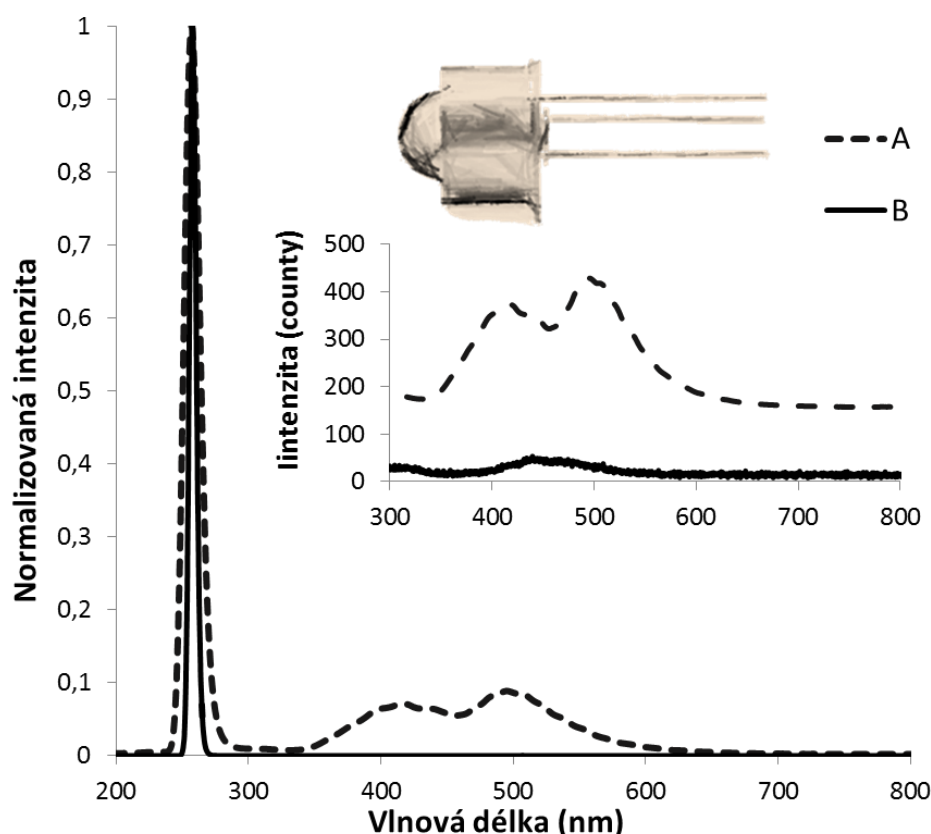


Obrázek 21: Fotografie modulární střednětlaké chromatografické stanice. Přiložena jednodolarová australská mince pro porovnání. Celá sestava je cca 25 cm x 25 cm velká a váží cca 0,7 kg. Pro srovnání je na vstřikovacím ventilu (vpravo dole) položen australský jednodolar.

5.4 Elektroluminiscenční zdroje hluboké UV emise pro fotometrickou detekci

Charakterizace LED zdrojů

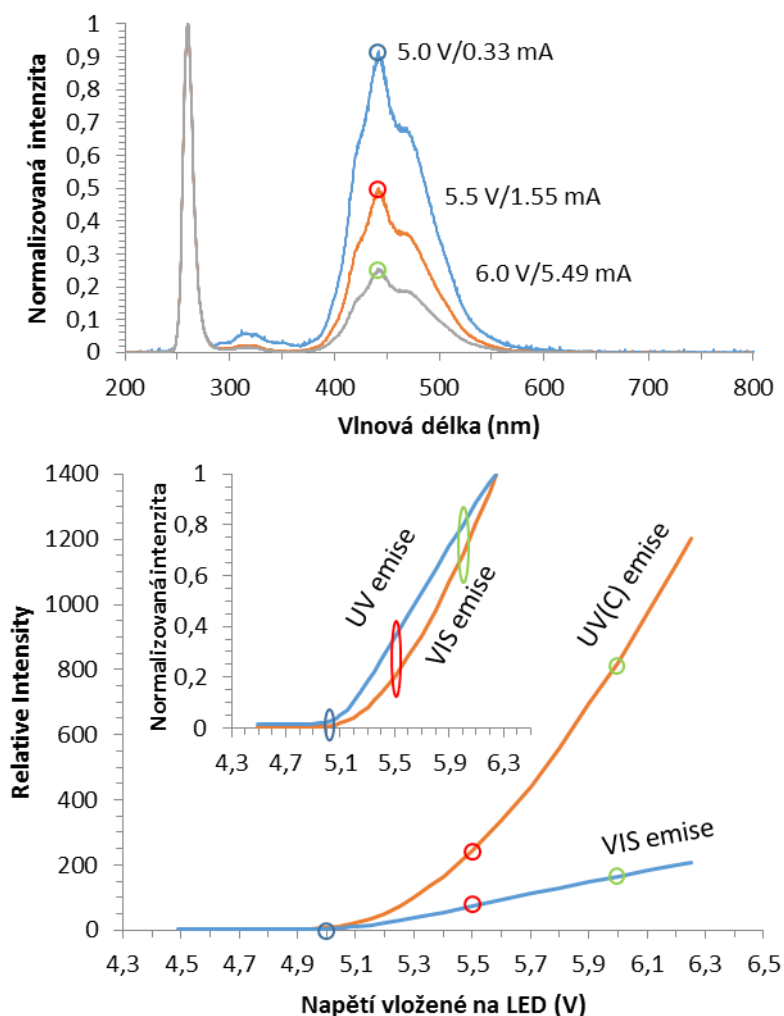
Proměřením emisních spekter LED zdrojů na hlubokou UV detekci byly získány údaje o skutečné hodnotě polohy maximální emise (nejsilnější pík) a informace o parazitním emisním pásu ve viditelné oblasti. Tato emise je typická pro LED zdroje zejména emitující kolem 255 nm a byla již dříve zaznamenána v práci [140]. Její původ nebyl dosud podrobně diskutován. Naměřená emisní spektra pro LED zdroje na 255 nm založených na materiálových substrátech starší řady AlGaIn a novější řady AlIn ukazuje Obrázek 22.



Obrázek 22: Emisní spektra 255 nm LED zdrojů: A: LED UV-TOP255-HL-TO39, založený na AlGaIn; B: OPTAN255H, založená na novějších materiálových substrátech AlN.

Jak ukazují normalizovaná emisní spektra 255 LED zdrojů, emise parazitního viditelného záření v oblasti 350-580 nm je u novější řady, založené na AlN, o několik řádů nižší. Rovněž šířka píku hlavního signálu je výrazně užší, což zvyšuje selektivitu vlnové délky. Odpadá tak větší potřeba užívat přídatné optické filtry na selekci žádaného emisního signálu, užitě například v práci [144] a nebo použití přídatné referenční fotodiody [145].

V rámci charakterizace LED zdrojů se ukázala možnost podat vysvětlení původu parazitního emisního pásu. Na LED bylo postupně zvyšováno vkládané napětí a současně pozorováno chování emitovaného spektra. Jemným zvyšováním napětí, obzvláště v počáteční fázi, kdy LED začala emitovat světlo, došlo k proměření nejvýznamnější oblasti zesilování intenzity spekter a bylo tak možno posoudit závislosti růstu emise v hluboké UV oblasti i ve viditelné oblasti na vloženém napětí a proudu. Polohy maxima ve viditelné oblasti (kolem 470 nm) byly znormalizovány k poloze maxima při 255 nm. Situaci zachycuje Obrázek 23.



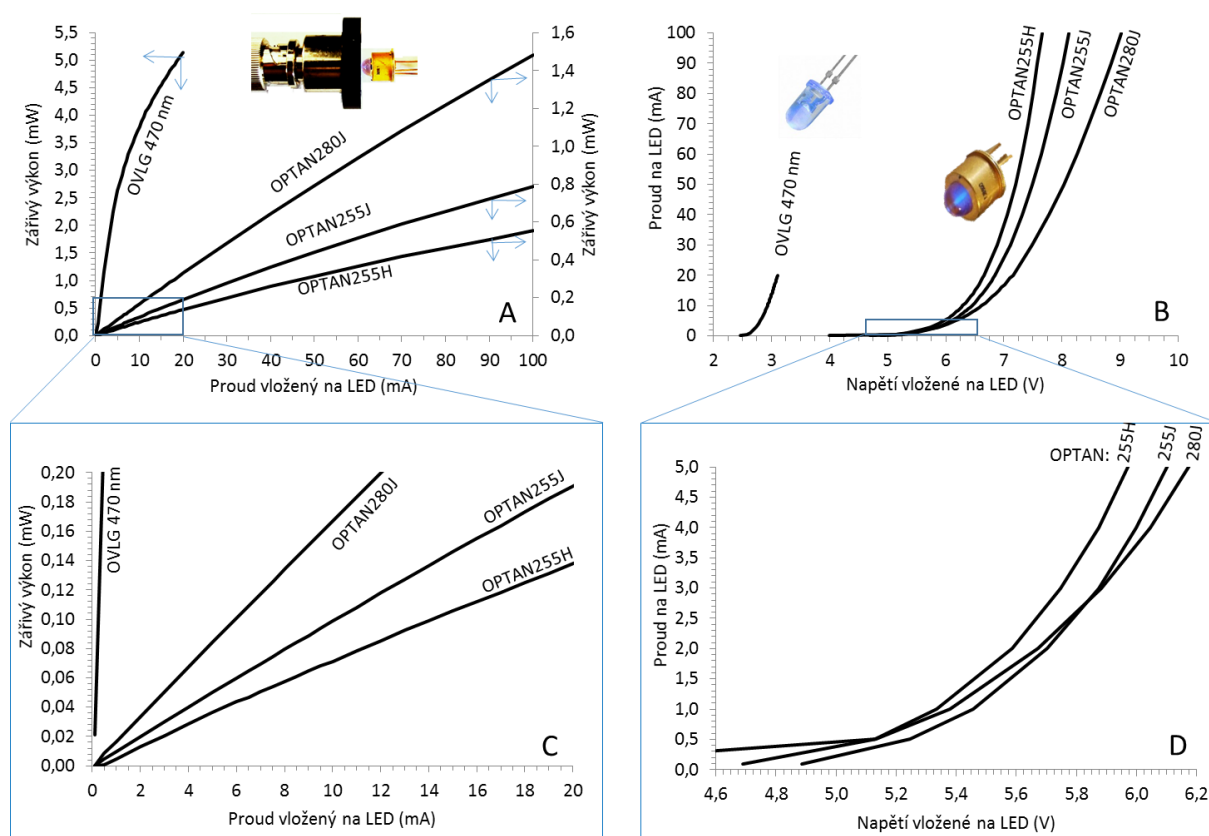
Obrázek 23: Změny spekter poskytovaných LED OPTAN255H v průběhu měněného vloženého napětí. Nahoře: výběr tří hodnot blízky začátku emise záření, normalizováno k maximu polohy kolem 255 nm. Dole: grafická závislost poloh maxim v UV a VIS oblasti v průběhu celé škály vkládaného napětí.

K původu parazitního emisního záření ve VIS oblasti se nabízely dvě hypotézy. První spočívala v předpokladu, že emise ve viditelné oblasti je projevem fluorescence vlivem UV záření na použitý polovodičový materiál. Druhá hypotéza spočívala v předpokladu, že viditelná emise je projevem poruch polovodičového materiálu, nečistot a stopových příměsí v užívaných materiálech.

Z měření vyplynulo, že při zvyšování napětí vkládané na LED zdroj se zvyšovaly intenzity emisního záření nerovnoměrně. Byl pozorován poměr zvyšování intenzity v UV a VIS oblasti a bylo zjištěno, že intenzita emise v UV oblasti roste razantně rychleji, než ve VIS oblasti a tuto oblast mnohonásobně překračuje. Toto pozorování potvrzuje hypotézu, že parazitní emisní pás ve VIS oblasti je dán spíše poruchami materiálů a nečistotami, než fluorescenčním

efektem, který by zvyšováním intenzity záření v UV oblasti zvyšoval i intenzitu záření ve VIS oblasti. Tato problematika je zpracovávána do samostatné publikace.

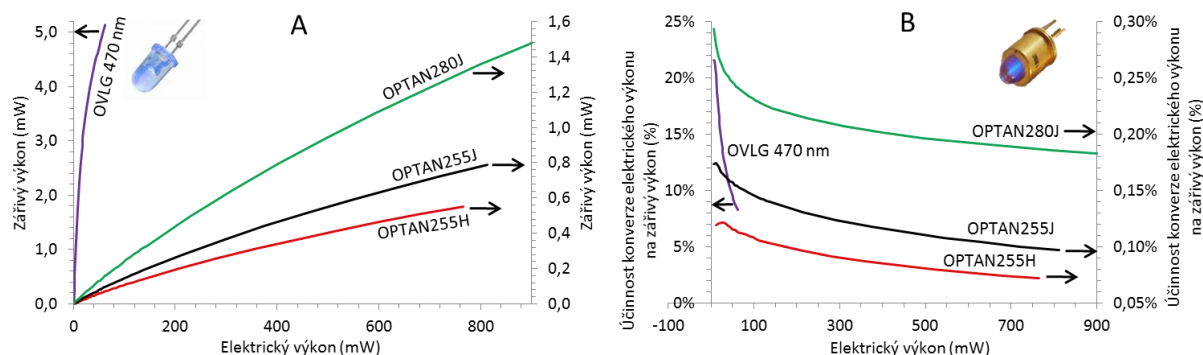
Byly proměřeny základní elektrické (volt-ampérové) charakteristiky LED zdrojů pro UV oblast pro nově dostupné LED (řada OPTAN – 255 nm a 280 nm) a pro srovnání byl proměřen současně za stejných podmínek i zástupce LED zdroje z VIS oblasti pro 470 nm, který je jedním z nejrozšířenějších a nejznámějších LED zdrojů. Charakteristiky zobrazuje Obrázek 24.



Obrázek 24: Optické (A) a elektrické (B) charakteristiky LED zdrojů pro hlubokou UV oblast (255 nm a 280 nm) a pro porovnání i VIS oblast (470 nm). Obrázky C a D jsou detaily významných částí grafů A a B.

Obdobné techniky charakterizace byly užity v [146] s aplikací na LED zdroje s hlubokou UV emisí založené na AlGaIn materiálech. Změřené hodnoty výkonu záření korespondovaly s uvedenými hodnotami v technických dokumentacích. Byly o něco nižší, což se předpokládalo vzhledem k nepoužívání integrační koule, která by dokázala zachytit i boční záření z LED zdrojů. Nebylo to však potřeba, protože pro účely použití LED v analytické instrumentaci, zejména v detektorech, je z pohledu použitelnosti zajímavé pouze záření jdoucí přímým směrem ze zdroje. Zářivé výkony UV LED zdrojů byly několikanásobně nižší než pro LED z VIS oblasti. To koresponduje se současným stavem materiálového vývoje

a trendů. Za poslední roky se zářivé výkony UV LED zdrojů zvýšily a vylepšila se jejich životnost, ale pořád polovodičové materiály nedosahují emisních výkonů jako materiály pro VIS oblasti. Optický výkon UV oblasti však plně postačuje pro analytické aplikace, kdy záření prochází v podstatě pár mikrometry vrstvy a při napájení vyšším proudem již dochází k saturaci signálu na fotodiodě. Proto výkon UV LED kolem 1 mW je dostačující. Graf A (Obrázek 24) ukazuje závislost zvyšování zářivého výkonu se zvyšující se vlnovou délkou. Na tomtéž obrázku graf B zobrazuje proměřené volt-ampérové charakteristiky, které se měří typicky jako základní charakteristika LED zdrojů. Z nich plyne trend, že se zvyšující se vlnovou délkou klesá napětí potřebné pro emisi záření (začíná procházet proud). UV LED zdroje mají výrazně posunutý počátek emise až po vložení hodnot nad 5 V. To koreluje s pozorováním a diskusí v článku [116]. Malý rozdíl mohou vykazovat LED zdroje emitující záření při 255 nm a 280 nm. Zdroj emitující při 255 nm začíná emitovat záření dříve. To může být dáno odlišnou použitou technologií a materiálem, který do značné míry ovlivňuje tyto hodnoty napětí a proudu a hladinu napětí kdy je překonán odpor polovodiče a LED zdroj začne emitovat záření. Proto také LED zdroje při stejné vlnové délce od různých výrobců mají rozdílné hodnoty pracovního napětí.



Obrázek 25: Hodnoty závislosti zářivého výkonu na elektrickém výkonu (A) a % konverze elektrického výkonu na zářivý výkon (B).

Z naměřených parametrů byly spočítány hodnoty zářivého výkonu a v závislosti na elektrickém výkonu a z těchto hodnot byly přepočítány % konverze elektrického výkonu na zářivý výkon, čili kolik elektrické energie se přemění na emitované záření. Situaci zachycuje Obrázek 25. V případě UV LED zdrojů jsou to pouze desetiny procent oproti VIS LED zdroji, který dosahoval kolem 10 %. Celkově takto nízké emisní výtěžky v UV oblasti jsou zatím běžné a i proto oblast výzkumu v hledání nových materiálů a jejich kombinace a možností ve vývoji

polovodičů emitujících záření pod 300 nm je stále jedním z velkých zájmů vědecké i průmyslové oblasti.

Souhrnné výsledky týkající se charakterizace LED zdrojů shrnuje Tabulka 4. Zde jsou uvedeny parametry změřené, spočítané, nebo získané z technické dokumentace od výrobců. Zahrnutý jsou 3 LED zdroje na hlubokou UV emisi (255 nm a 280 nm) založené na novějším používaném polovodičovém substrátu AlN, jedna UV LED (255 nm) založená na starším typu polovodiče AlGaIn a pro srovnání jedna LED z VIS oblasti (470 nm)

Tabulka 4: Souhrnná data získaná z měření a technické dokumentace pro testované LED zdroje.

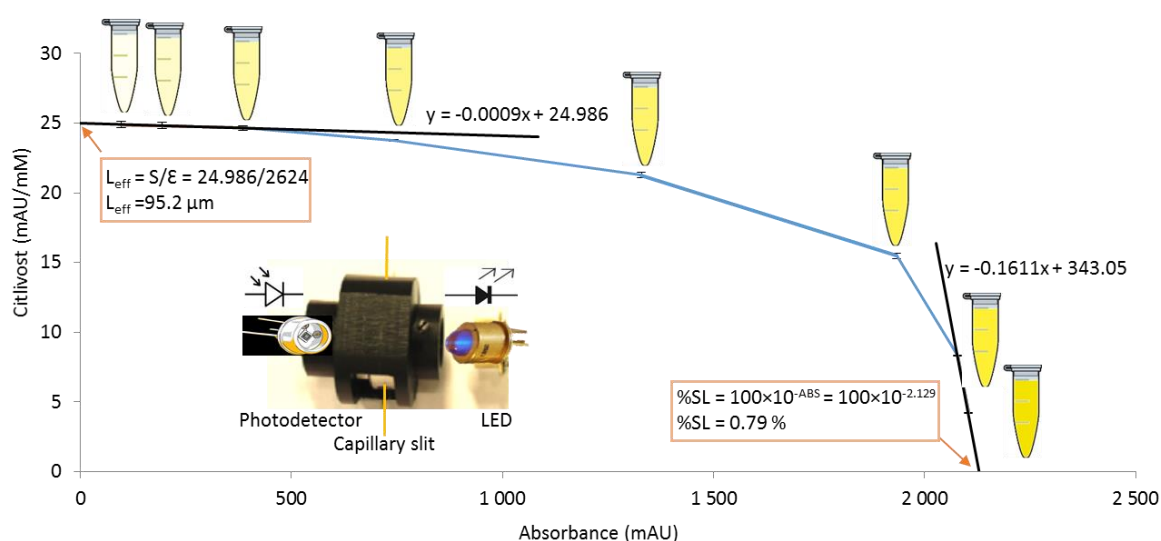
LED zdroj (katalog. označení)	Vložený Proud (mA)	Napětí (V)	Elektrický výkon (mW)	Vlnová délka hlavního píku (nm)*	Zářivý výkon (mW)**	Šířka emisního hlavního píku (nm)	Zářivý výkon dle technické dokumentace	Životnost (Hodiny)***	Materiál polovodiče	Cena (USD \$)
OPTAN255H	100	7,653	765,3	260	0,55	11	0,5–1,0 mW	3000	AlN	300
OPTAN255J	100	8,123	812,3	257	0,79	11	1,0–2,0 mW	3000	AlN	300
OPTAN280J	100	9,023	902,3	279	1,48	12	1,0–2,0 mW	3000	AlN	300
OVLGB0C6B9 (470 nm)	20	3,105	62,1	469	5,14	22	7 200 mcd	100 000	InGaIn	0,5
UV–TOP255–HL– TO39)****	30	6,5	150	260	0,30	12	0,2 mW	100	AlGaIn	300

* Emisní maximum při maximální intenzitě; ** Počítáno pro vlnovou délku píku o maximální intenzitě užitím hodnoty vloženého proudu; *** Pro kontinuální mód, pro 50% poklesu intenzity; **** Parametry převzaty z výrobních technických specifikací a nebo měřeny v publikaci (Macka a kol., 2009).

V tabulce jsou uváděny i hodnoty životnosti pro jednotlivé druhy LED zdrojů. Nově používaný polovodičový materiál AlN slibuje životnost kolem 3000 hodin v kontinuálním módu a 6000 hodin v pulsním módu. Během práce s LED OPTAN255H byly na začátku měřené hodnoty zářivého výkonu naprosto identické s hodnotami po 300 hodinách. Což je pokrok oproti LED UV–TOP255–HL–TO39, tedy s užitým starším typem polovodiče, která velmi razantně slábala již po pár hodinách provozu. To koreluje s deklarovanou životností.

Charakterizace LED detektorů

Metodikou vhodnou pro charakterizaci optických detektorů různých uspořádání [142] byly charakterizovány LED absorbanční detektory – kapilární se štěrbinou a nanolitrová Z-cela. Pro výpočty efektivní délky a bočního světla, které určuje mez linearity detektoru, byl sestaven graf závislosti citlivosti na absorbanci. Příklad situace pro LED kapilární detektor, výpočty a uspořádání zobrazuje Obrázek 26.



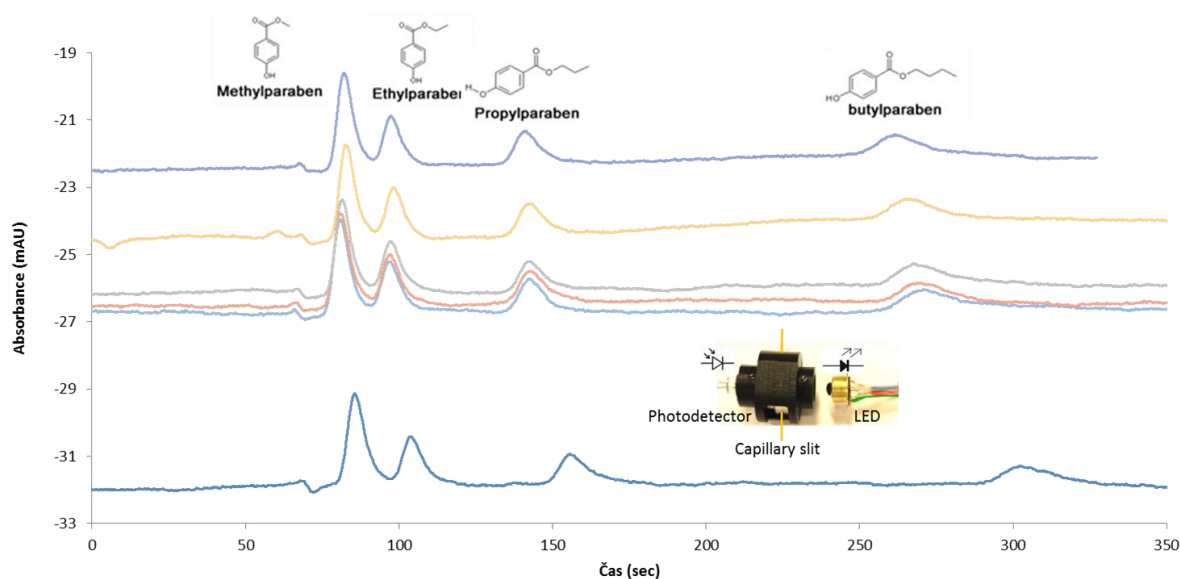
Obrázek 26: Graf citlivosti versus absorbance pro kapilární LED detektor.

Pro situaci s průtokovou nanolitrovou Z-celou byla situace obdobná.

Efektivní délka pro kapilární LED detektor byla stanovena na 95,2 μm . Udávaný vnitřní průměr použité kapiláry byl 100 μm . Vzhledem k zakřivením a nerovnostem kapiláry, může být logicky efektivní délka kratší. Většina záření je určitým způsobem rozptýlena a jen velmi malá část jde přímou cestou skrz kapiláru. % rozptýleného světla 0,79 je také slušné, většina komerčně dodávaných optických detektorů má toto procento do 1 %. U Z-cely výsledky stanovení efektivní délky přinesly zajímavé zjištění. V uspořádání kdy byl LED zdroj (255 nm) v určité vzdálenosti od štěrbin Z-cely byla efektivní délka cely stanovena na 3 mm oproti deklarovaným 8 mm. To mohlo být způsobeno větším rozptylem světla a nedostatečným prostupem světla kapilárou v Z-celě. Pro zvýšení citlivosti detekce však její použití bylo dostatečné a další předmět výzkumu týkající se problematiky Z-cely a zlepšení jejich detekčních vlastností nebyl předmětem této práce, je na něm pokračováno v samostatném výzkumu. % bočního světla bylo rovněž do 1 %.

Použití LED detektoru v miniaturizované chromatografické sestavě

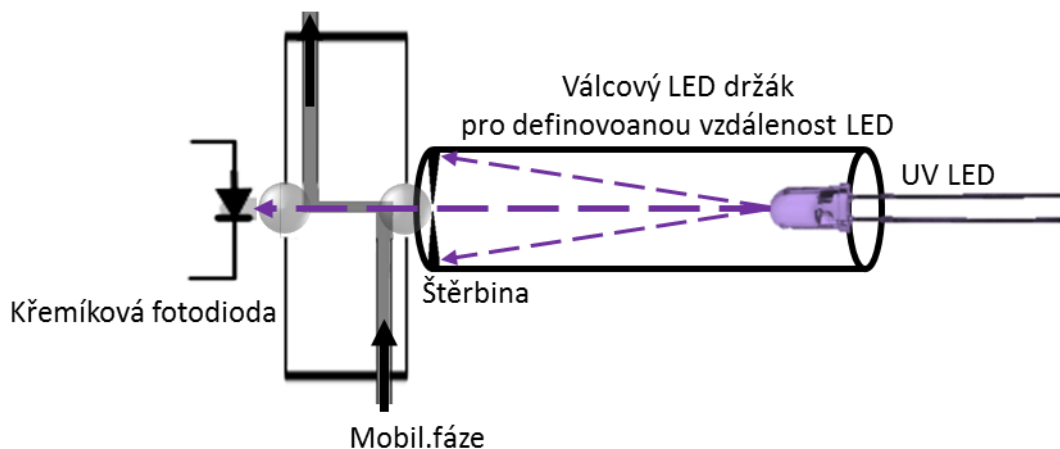
Jako první byl zkoušen LED kapilární absorbanční detektor se štěrbinou. Byl zapojen do systému na vyvíjenou platformu popsanou v kapitole 4.3 v módu izokratické separace na chromatografické koloně a jako modelové analyty pro separaci sloužila směs derivátů kyseliny p-hydroxybenzoové (parabeny). Chromatografický záznam úspěšné separace ukazuje Obrázek 27. Bližší experimentální podmínky byly popsány v experimentální části.



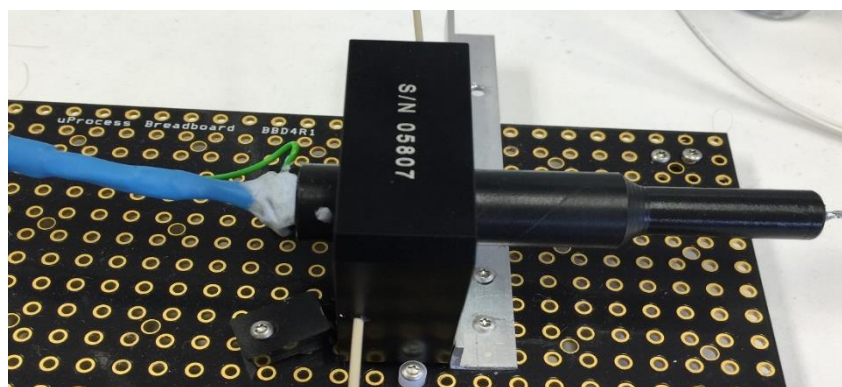
Obrázek 27: Chromatografická izokratická separace směsi parabenů. Podmínky viz experimentální část.

Toto uspořádání poskytovalo uspokojivé detekční limity (řádově $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), separace jednotlivých analytů byla dostatečná (rozlišení nad 1,5). Šum základní linie byl pod 10^{-4} absorbančních jednotek (AU). Poměr signál k šumu byl 10. Krátká optická dráha skrze kapiláru (cca $100 \mu\text{m}$) neumožňovala dosažení výrazně nízkých detekčních limitů, jako u komerčních detektorů, kde optická dráha dosahuje několika centimetrů. Byly tedy hledány další varianty zvýšení limitů detekce a jednou z cest je použití komerčně dostupné Z-cely určené pro průtoky v řádech $\mu\text{L}/\text{min}$. Schéma zapojení LED uspořádání se Z-celou zobrazuje Obrázek 28 a Obrázek 29. Z jedné strany byl umístěn LED zdroj světla ve válcové trubici, která dovoľovala nastavitelnou vzdálenost mezi štěrbinou Z-cely a LED zdrojem. Testování vlivu této vzdálenosti nebylo předmětem této práce a pro testování byla zvolena maximální možná

vzdálenost (8 cm). Z druhé strany Z-cely byla umístěna fotodioda, těsně přiléhající na štěrbinu Z-cely.

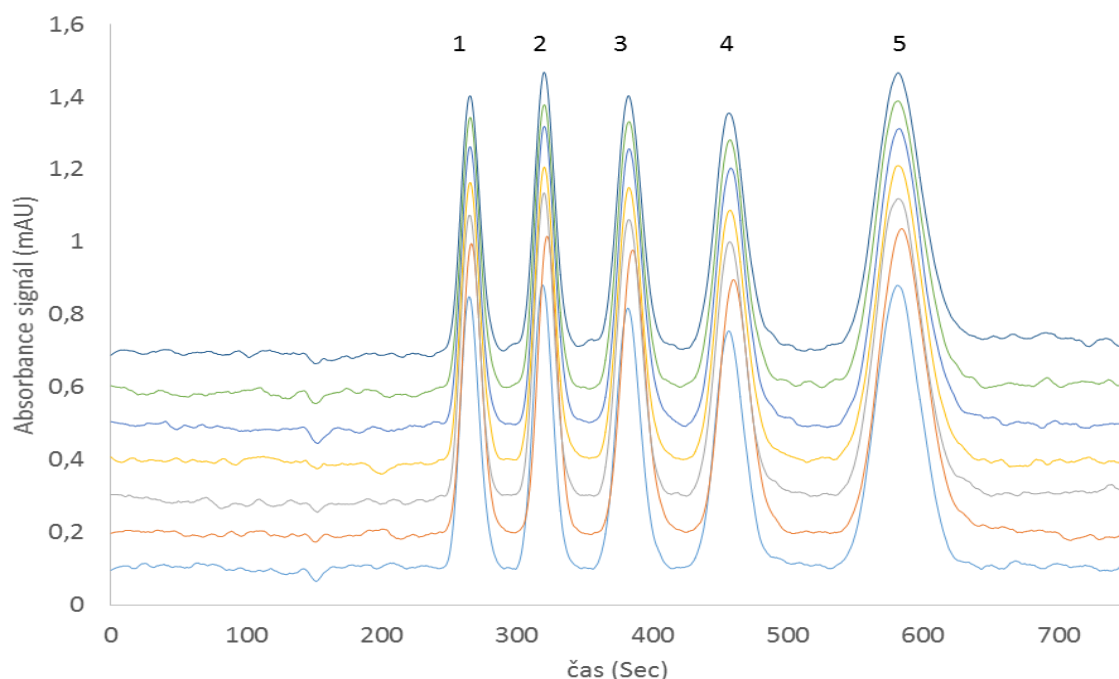


Obrázek 28: Schéma zapojení průtokové Z-cely s LED zdrojem a fotodiódou.



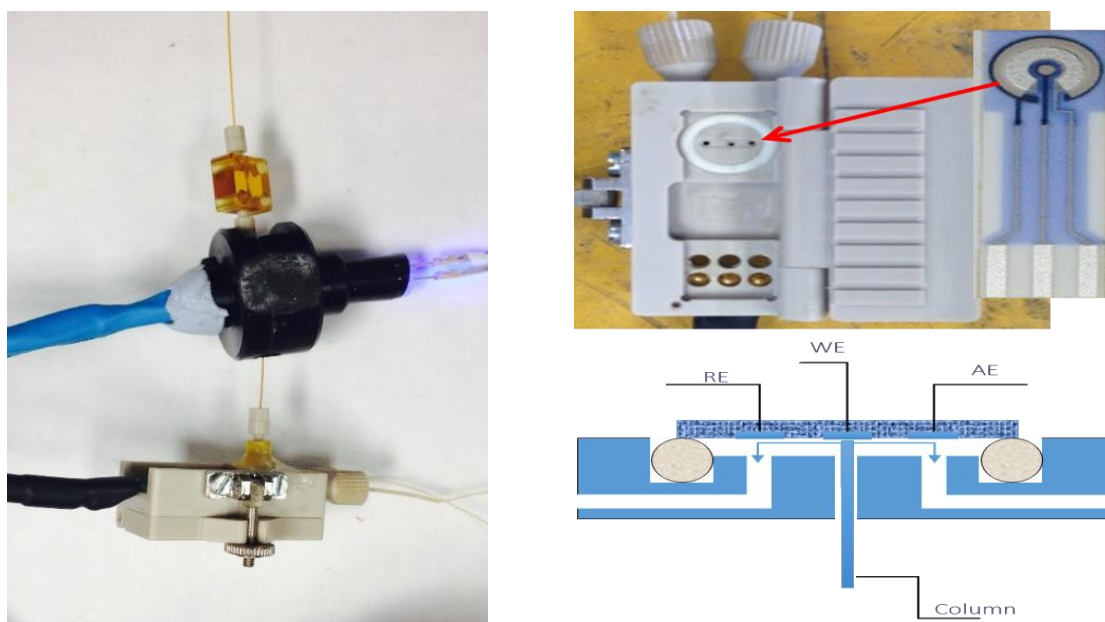
Obrázek 29: fotografie zapojení Z-cely s LED zdrojem a fotodiódou.

Průtoková Z-cela byla testována ve spojení s komerčním chromatografickým systémem (popsáno v experimentální části), aby došlo ke snížení vlivů možných chyb majících vyvíjená platforma pro chromatografické separace. Použity tak byly standardně používané pumpy a kolony a nový prvek byla testovaná Z-cela. S ohledem na použitý typ chromatografické separace byly voleny analyty separovatelné iontovou chromatografií. Chromatografický záznam systému s použitím Z-cely ukazuje Obrázek 30. Zde je patrné výrazné zvýšení hodnoty signálu k šumu na 20 a absorbanční šum základní linie se snížil o řád (pod $5 \cdot 10^{-5}$ AU).



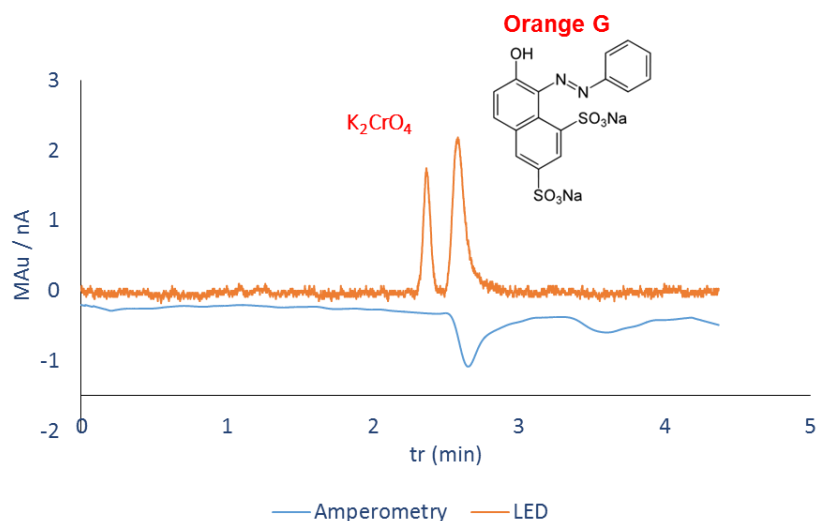
Obrázek 30: Gradientová separace analytů s užitím průtokové Z-cely a LED zdroje s hlubokou UV emisí. Identifikace píků: 1. L-DOPA ($0.08\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), 2. octopamine ($0.13\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), 3. synephrine ($0.12\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), 4. phenylephrine ($0.12\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a 5.5-hydroxytryptophan ($0.09\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Další podmínky viz experimentální část.

Poslední testovanou variantou bylo tandemové spojení různých detekčních technik v jedné analýze. Testováno bylo spojení měření absorbance v hluboké UV oblasti a elektrochemické detekce (amperometrické). Detailnější popis poskytuje experimentální část. Schéma ukazuje Obrázek 31.



Obrázek 31: Zapojení absorbančního LED detektoru ve spojení s elektrochemickým detektorem (vpravo) a detail elektrochemické cely a schéma jejího uspořádání (vpravo).

V prvním případě bylo toto spojení testováno za použití LED ve VIS oblasti (470 nm) při separaci na monolitické koloně na C18 fázi. Separováno bylo barvivo Orange G a dichroman draselný, který v koloně nebyl zadržován a vycházel v mrtvém čase. Dichroman draselný byl schopen poskytovat signál při amperometrické detekci. Tuto analýzu zobrazuje Obrázek 32.



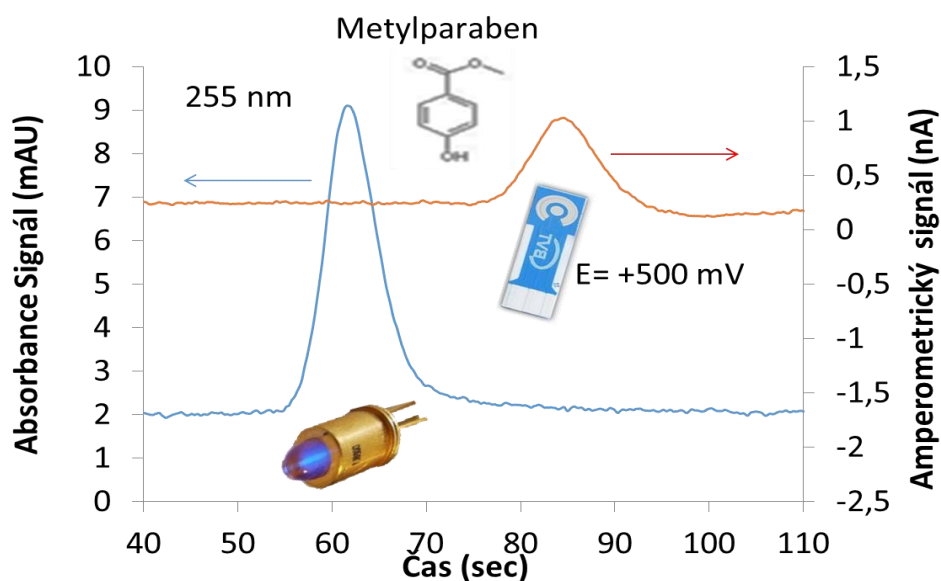
Obrázek 32: Izokratická separace dichromanu draselného a Orange G na C18 monolitické koloně. Bližší podmínky viz experimentální část.

Analytické parametry této separace shrnuje Tabulka 5. Tento experiment prokázal možnost užití signálů z obou detektorů zároveň a prokázal použitelnost této tandemové techniky pro analyty, které vykazují jak optické tak elektrochemické schopnosti odezvy.

Tabulka 5: Analytické parametry separace dichromanu draselného a Orange G na C18 koloně.

Složka	Tr (min)	RSD % Tr	Plocha píku (mAU*t)	RSD % Plochy píku	N Teor.patro/m
K ₂ CrO ₄	2.39	1 %	144	3 %	56,000 ± 5600
Orange G	2.61	3 %	157	3 %	25,000 ± 2300

Po otestování možnosti spojení LED detektoru ve VIS oblasti s elektrochemickým detektorem následovalo ověření spojení detektoru založeného na LED zdroji pro hlubokou UV emisi ve spojení s elektrochemickým detektorem. Tato varianta byla realizována v módu průtokové vstřikovací analýzy. Jako testovaný analyt byl zvolen methylparaben. Analýzu a získané signály ukazuje Obrázek 33.



Obrázek 33: FIA analýza methylparabenu při testování tandemového spojení LED detekce s 255 nm LED a amperometrické detekce.

Takto bylo úspěšně otestováno spojení elektrochemické detekce (amperometrický mód) ve spojení s detekcí v oblasti hluboké UV emise, kdy byl použit jeden analyt a v jedné analýze zachycen dvěma nezávislými typy detekce. Bylo tak prokázáno možnost zapojení dvou nezávislých typů detekce, kdy lze jedním nebo druhým detektorem selektivněji identifikovat danou sloučeninu na základě jejich vlastností z hlediska optických vlastností (absorbance) a jejich elektrochemických vlastností (potřebný potenciál pro redox reakci)

Zároveň tak bylo poprvé otestováno spojení hluboké UV LED emise v absorbančním detektoru ve spojení s elektrochemickým koncově kapilárním detektorem v mikrofluidických systémech. Bližší testování podmínek elektrochemické cely přesahovaly rámec této práce.

Problematika vývoje portabilních systémů byla řešena v rámci zahraniční stáže v centru pro separační vědy (ACROSS) na University of Tasmania v Austrálii. Vzhledem k omezenému času pro výzkum nebyly systémy širěji aplikovány na reálné analýzy, pouze otestován potenciál užití těchto technik na modelové analyty. Výsledky byly publikovány na zahraničních konferencích a jedno plakátové sdělení (uvedeno v kapitole 11.4) získalo ocenění prvního místa v posterové sekci na mezinárodní mikrofluidickém sympoziu.

6 ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ A BUDOUCÍ VÝZKUMNÉ SMĚRY

V rámci dizertační práce byla řešena problematika použití elektromigračních technik při stanovení vybraných analytů, vývoje přenositelného chromatografického systému a charakterizace novějšího typu UV LED zdroje a detekčního systému. Podstatné závěry lze shrnout následujícím způsobem:

Při použití konvenčních technik došlo k aplikaci stávajících metod na větší počet vzorků s částečnou optimalizací metod. Cílem práce bylo získat výsledky obsahu příslušných látek (kaseinů a organických kyselin).

- Pomocí techniky kapilární zónové elektroforézy byla dosažena separace 6 základních kaseinových frakcí v jedné analýze. Ta zabrala delší čas (asi 110 minut, ale zahrnovala úplnou separaci všech frakcí, oproti předchozím publikovaným článkům.
- Kapilární zónová elektroforéza byla aplikována na analýzu vzorků vinného moštu kvašeného rozdílnými kvasinkami. Byl sledován průběh kvašení z hlediska změn základních krátkořetězcových organických kyselin. Mezi vzorky moštu kvašeného rozdílnými kvasinkami nebyly pozorovatelně velké rozdíly, pouze rychlost odbourání kyseliny jablečné na mléčnou byla rozdílná. Výsledky byly publikovány v časopise obsaženém v databázi Scopus.
- Byla vyvinuta a otestována mikrofluidická přenositelná chromatografická stanice. Použity byly až na vstřikovací ventil a detekční systém komerčně dostupné součásti. Jednotlivé části systému byly charakterizovány: testovány tlakové limity, šum, schopnost přesně generovat a reprodukovat gradient. Sestava byla testována pro izokratickou separaci směsi barviv a parabenů a gradientová eluce byla demonstrována na směsi barviv. Problematika byla publikována v renomovaném impaktovaném vědeckém časopise zaměřeného na novinky v analytické chemii.
- Byly charakterizovány nově komerčně dostupné LED zdroje emitující záření v oblasti hluboké UV emise založené na materiálovém polovodičovém substrátu AlN. Byly stanoveny spektrální charakteristiky, zářivý výkon a elektrické volt-ampérové charakteristiky. Tyto charakteristiky byly porovnány pro novou a starší řadu UV LED zdrojů. LED zdroje byly implementovány do různých forem LED absorbančních detektorů – jednoduchého

šterbinového kapilárního detektoru a do Z-cely a tyto detektory byly charakterizovány z hlediska linearity a efektivní optické délky. Použití detektorů bylo demonstrováno na analýzách modelových analytů – parabenů. Bylo úspěšně otestováno spojení absorbančního detektoru a elektrochemického amperometrického detektoru pro použití analýz v jednom kroku. Tato část problematiky je sepisována pro podání v impaktovaném časopise a byla prezentována na řadě posterů, z nichž jeden získal ocenění prvního místa v posterové sekci na mezinárodním mikrofluidickém sympoziu.

Do budoucna je zde prostor pro implementace daných přenositelných technik v analýzách přímo na místě odběru, nebo začlenění daných technik přímo do procesu technologické výroby. Nabízí se zde i možnost propojení s dalšími detekčními systémy a transfer metod ze stávajících stolních přístrojů na přenositelné systémy. To platí i pro použité konvenční techniky aplikací elektromigračních technik na analýzy organických kyselin a kaseinových frakcí, které mají prostor pro transfer metod na jednodušší miniaturizované systémy, posouzení předností a nedostatků těchto přesunů. Nabízí se i kombinace vyvíjených technik s poznatky publikovanými autory ze současné doby, pro zvýšení limitů detekce, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti analýz a celkové snížení nákladů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ES	Evropská směrnice
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis)
EOF	Elektroosmotický tok (Electroosmotic flow)
BGE	Základní elektrolyt (Background electrolyte)
MHEC	(Hydroxyethyl)methyl celulóza
DTT	DL-Dithiothreitol
UV-VIS	Ultrafialová-viditelná část spektra
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
HPMC	(Hydroxypropyl)methyl celulóza
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromid
HDB	hexadimethrin bromid
TTAOH	Tetradecyltrimethylammonium hydroxid
(2-NPH)	2-nitrofenylhydrazin
EDC.HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-dikarbodiimid hydrochlorid
TTAB	Trimethyl(tetradecyl)ammonium bromid
MTAB	Myristyltrimethylammonium bromide bromid
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromid
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
P(HB-co-HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
MTAH	Myristyltrimethylammonium hydroxid
CTAH	Cetyltrimethylammonium hydroxid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

8 SEZNAM CITOVANÝCH LITERÁRNÍCH PRAMENŮ

- KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s.
- 1] ISBN 80-708-0510-2.
- ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Margita ČANIGOVÁ, Karol HERLAN, Michaela ČERNÍKOVÁ a Vendula PACHLOVÁ. *Mlieko a mliečne výrobky*. První. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2016, 254 s. ISBN 978-80-552-1451-1.
- 2]
- DRDÁK, Milan. *Základy potravinárskych technológií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 511 s. ISBN 80-967-0641-1.
- 3]
- GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 78 s. ISBN 80-715-7657-3.
- 4]
- GAJDŮŠEK, Stanislav. *MLékařství II*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 135 s. ISBN 80-715-7342-6.
- 5]
- ALBILLOS, Silvia M., María D. BUSTO, Manuel PEREZ-MATEOS a Natividad ORTEGA. Analysis by capillary electrophoresis of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease on bovine caseins. *International Dairy Journal*. 2007, **17**(10), 1195-1200. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.02.003. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694607000398>
- 6]
- VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- 7]
- ŠRUBAŘOVÁ, P. a J. DVOŘÁK Analysis of genomic marker CSN2 in cow's milk: Analýza genomického markeru CSN2 v mléce skotu. In: *MendelNet'07 Agro – sborník z mezinárodní konference posluchačů postgraduálního doktorského studia: Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Mendelova zemědělská a
- 8]

lesnická univerzita v Brně: MZLU, Brno, 2007, s. 127-134. ISBN 978-80-7375-119-7.
Dostupné také z: mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/bioziv/srubarova.pdf

- 9] VALENTI, B., R.I. PAGANO a M. AVONDO Effect of diet at different energy levels on milk casein composition of Girgentana goats differing in CSN1S1 genotype. *Small Ruminant Research*. 2011, **93**(2-3), 135–139. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2011.11.013. ISSN 09214488. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448811004524>

- 10] AMIGO, Lourdes, Isidra RECIO a Mercedes RAMOS. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk ? a review. *International Dairy Journal*. 2000, **10**(3), 135-149. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00034-0. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694600000340>

- 11] KUČEROVÁ, Jitka, Eva NĚMCOVÁ ŠTÍPKOVÁ, Irena VRTKOVÁ, Josef DVOŘÁK, Jan FRELICH, Josef BOUŠKA a Miroslav MARŠÁLEK. The influence of markers CSN3 and ETH10 on milk production parameters in czech pied cattle. *Journal of Central European agriculture*. 2004, **5**(4), 303-308. ISSN 1332-9049. Dostupné také z: <http://jcea.agr.hr/volumes.php?lang=en&search=Article%3A211&field=title>

- 12] KERESTEŠ, Ján. *Mlieko vo výžive ľudí*. První. Bratislava: Cad Press, 2016. ISBN 978-80-88969-72-3.

- 13] ORDIALES, Elena, Alberto MARTÍN, María José BENITO, Alejandro HERNÁNDEZ, Santiago RUIZ-MOYANO a María de Guía CÓRDOBA. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in ?Torta del Casar? cheese-making. *Food Chemistry*. 2012, **133**(1), 227-235. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.012. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612000258>

- 14] RECIO, Isidra, Lourdes AMIGO a Rosina LÓPEZ-FANDIÑO. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, **697**(1-2), 231-242.

DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00085-6. ISSN 03784347. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434797000856>

- 15] LARA-VILLOSLADA, Federico, Monica OLIVARES a Jordi XAUS. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *Journal of Dairy Science*. 2005, **88**(5), 1654-1660. ISSN 00220302. Dostupné také z:
http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=3&SID=X175iF1PfBbhfEMbPkK&page=1&doc=2

- 16] PHELAN, Martha, Aisling AHERNE, Richard J. FITZGERALD a Nora M. O'BRIEN. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009, **19**(11), 643-654. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.06.001. ISSN 09586946. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609001071>

- 17] RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Approach to the quantification of milk mixtures by partial least-squares, principal component and multiple linear regression techniques. *Food Chemistry*. 2006, **98**(4), 782-789. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.037. ISSN 03088146. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006199>

- 18] RODRIGUEZ-NOGALES, José Manuel a Fausto VÁZQUEZ. Application of electrophoretic and chemometric analysis to predict the bovine, ovine and caprine milk percentages in Panela cheese, an unripened cheese. *Food Control*. 2007, **18**(5), 580-586. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.02.003. ISSN 09567135. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506000260>

- 19] CIFUENTES, Alejandro. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *ELECTROPHORESIS*. 2006, **27**(1), 283-303. DOI: 10.1002/elps.200500474. ISSN 0173-0835. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500474>

- 20] MÜLLER, Lukáš, Petr BARTÁK, Petr BEDNÁŘ, Iveta FRYŠOVÁ, Juraj ŠEVČÍK a Karel LEMR. Capillary electrophoresis-mass spectrometry – a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration. *ELECTROPHORESIS*. 2008, **29**(10), 2088-

2093. DOI: 10.1002/elps.200700794. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200700794>

- 21] GASILOVA, Natalia a Hubert H. GIRAULT Component-Resolved Diagnostic of Cow's Milk Allergy by Immunoaffinity Capillary Electrophoresis–Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**(13), 6337-6345. DOI: 10.1021/ac500525n. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac500525n>

- 22] SUTTON, J.D. Altering Milk Composition by Feeding. *Journal of Dairy Science*. 1989, **72**(10), 2801–2814. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79426-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030289794261>

- 23] VARGA, Gabriella, A. a Virginia, A. ISHLER Managing Nutrition for Optimal Milk Components. In: *Western Dairy Management Conference* [online]. Reno, Nevada, USA, 2007, s. 1-14 [cit. 2016-06-16].

- 24] KENNELLY, John, J., John, A. BELL, Aileen, F. KEATING a Lorraine DOEPEL. Nutrition as a Tool to Alter Milk Composition. *Advances in Dairy Technology*. 2005, **17**(1), 255-275.

- 25] JENKINS, T.C. a M.A. MCGUIRE Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science*. 2006, **89**(4), 1302-1310. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72198-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206721981>

- 26] DEPETERS, E.J. a J.P. CANT Nutritional Factors Influencing the Nitrogen Composition of Bovine Milk: A Review. *Journal of Dairy Science*. 1992, **75**(8), 2043-2070. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77964-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030292779648>

- 27] MURPHY, J.J. a F. O'MARA Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on the dairy industry. *Livestock Production Science*. 1993, **35**(1-2), 117-134. DOI: 10.1016/0301-6226(93)90185-K. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030162269390185K>

- EMERY, R.S. Feeding For Increased Milk Protein. *Journal of Dairy Science*. 1978, **61**(6), 825-828. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(78)83656-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203027883656X>
- 28] DE JONG, N., S. VISSER a C. OLIEMAN Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1993, **652**(1), 207-213. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80661-Q. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739380661Q>
- 29] IZCO, Jesús M., Mónica TORMO a Rafael JIMÉNEZ-FLORES. Development of a CE Method to Analyze Organic Acids in Dairy Products: Application to Study the Metabolism of Heat-Shocked Spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(7), 1765-1773. DOI: 10.1021/jf010929i. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010929i>
- 30] IRIGOYEN, Aurora, Jesús Mar??a IZCO, Francisco Clemente IBÁÑEZ a Paloma TORRE. Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881**(1-2), 59-67. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01276-5. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399012765>
- 31] MIRALLES, Beatriz, Volker ROTHBAUER, Mar??a A MANSO, Lourdes AMIGO, Ingolf KRAUSE a Mercedes RAMOS. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-?-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2001, **915**(1-2), 225-230. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00617-3. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301006173>
- 32] ORTEGA, N., S.M. ALBILLOS a M.D. BUSTO Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*. 2003, **14**(5), 307-315. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00095-6. ISSN 09567135. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713502000956>
- 33] MIRALLES, Beatriz KRAUSE, Mercedes RAMOS a AMIGO. Comparison of capillary electrophoresis and isoelectric focusing for analysis of casein/caseinate
- 34]

addition on processed cheeses. *International Dairy Journal*. 2006, **16**(12), 1448-1453. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.010.025. ISSN 09586946. Dostupné také z: http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=Y2P%40A6lfGg%40edEm8ABa&product=WOS&qid=14&search_mode=GeneralSearch

- 35] MANSO, M.A., M. MIGUEL a R. LÓPEZ-FANDIÑO Application of capillary zone electrophoresis to the characterisation of the human milk protein profile and its evolution throughout lactation. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1146**(1), 110-117. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.100. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730700180X>

- 36] HAM, J.S., S.G. JEONG, S.G. LEE et al. Irradiation effect on α - and β -caseins of milk and Queso Blanco cheese determined by capillary electrophoresis. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009, **78**(2), 158-163. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2008.09.008. ISSN 0969806x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X08002314>

- 37] HAM, J.-S., S.-G. LEE, S.-G. JEONG, M.-H. OH, D.-H. KIM a Y.W. PARK Characteristics of Korean-Saanen goat milk caseins and somatic cell counts in comparison with Holstein cow milk counterparts. *Small Ruminant Research*. 2011, **93**(2-3), 202-205. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.05.006. ISSN 09214488. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448810001562>

- 38] IUKALO, A. V. Identification of protein fractions of milk cows casein complex. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2015, **87**(4), 87-91. DOI: 10.15407/ubj87.04.087. ISSN 24094943. Dostupné také z: <http://ukrbiochemjournal.org/2015/07/identification-of-protein-fractions-of-milk-cows-casein-complex.html>

- 39] LECOEUR, Marie, Pierre GAREIL a Anne VARENNE. Separation and quantitation of milk whey proteins of close isoelectric points by on-line capillary isoelectric focusing?Electrospray ionization mass spectrometry in glycerol?water media. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(46), 7293-7301. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.09.043. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310012793>

- GUBIC, Jasmina, Jelena TOMIC, Aleksandra TORBICA, Mirela ILICIC, Tatjana
- 40] TASIC, Ljubisa SARIC a Sanja POPOVIC. Characterization of several milk proteins in Domestic Balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2016, **22**(1), 9-15. DOI: 10.2298/CICEQ150105013G. Dostupné také z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721500013G>
- COSTA, Fabiano Freire, Maria Aparecida VASCONCELOS PAIVA BRITO,
- 41] Marco Antônio MOREIRA FURTADO, Marta Fonseca MARTINS, Marcone Augusto LEAL DE OLIVEIRA, Patrícia MENDONÇA DE CASTRO BARRA, Lourdes AMIGO GARRIDO a Alessa SIQUEIRA DE OLIVEIRA DOS SANTOS. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. *Analytical Methods*. 2014, **6**(6), 1666-1673. DOI: 10.1039/c3ay41706a. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41706a>
- JACKSON, Ronald S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed.
- 42] Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 978-012-3736-468.
- FLEET, edited by Graham H. *Wine microbiology and biotechnology*. 1st
- 43] published, Reprinted. London: Taylor, 2002. ISBN 04-152-7850-3.
- FRAZIER, Richard. *Capillary Electrophoresis for Food Analysis: Method*
- 44] *Development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, 127 s. ISBN 08-540-4492-2.
- SÁDECKÁ, J a J POLONSKÝ. Electrophoretic methods in the analysis of
- 45] beverages. *Journal of Chromatography A*. 2000, **880**(1-2), 243-279. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00426-X. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730000426X>
- ALHUSBAN, Ala, Michael BREADMORE a Rosanne GUIJT Capillary
- 46] electrophoresis for monitoring bioprocesses. *Electrophoresis*. 2013, **34**(11), 1465-82. DOI: 10.1002/elps.201200646. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201200646>
- BRANDT, K., C. LEIFERT, R. SANDERSON a C. J. SEAL Agroecosystem
- 47] Management and Nutritional Quality of Plant Foods: The Case of Organic Fruits and

Vegetables. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2011, **30**(1-2), 177-197. DOI: 10.1080/07352689.2011.554417. ISSN 07352689. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.554417>

- LENA DO NASCIMENTO SILVA, Flamys, Eduardo Morgado SCHMIDT, Cláudio
48] Luiz MESSIAS, Marcos Nogueira EBERLIN a Alexandra Christine HELENA FRANKLAND SAWAYA. Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* [online]. 2015, **7**(1), 53-62 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1039/C4AY00114A. ISSN 17599660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AY00114A>

- GOMEZ, Federico J. V., Romina P. MONASTERIO, Verónica Carolina Soto
49] VARGAS a María F. SILVA Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2012, **33**(15), 2240-2252 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.201100595. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201100595>

- ZIMMERMANN, F a K ENTIAN. *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology, and applications*. Lancaster, PA: Technomic Pub., 1997, 567 s. ISBN 15-667-6466-1.
50]

- MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New
51] York: Springer, 2009, 735 s. ISBN 9780387741185-.

- RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE.
52] *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006. ISBN 04-700-1037-1.

- LAMIKANRA, Olusola, Inyang D. INYANG a Stephen LEONG. Distribution and
53] Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1995, **43**(12), 3026-3028 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1021/jf00060a007. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00060a007>

- CHIDI, Boredi S., Debra ROSSOUW a Florian F. BAUER Identifying and
54] assessing the impact of wine acid-related genes in yeast. *Current Genetics*. 2016, **62**(1), 149-164. DOI: 10.1007/s00294-015-0498-6. ISSN 01728083. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-015-0498-6>

- GAROFALO, C., M. EL KHOURY, P. LUCAS, M. BELY, P. RUSSO, G. SPANO a V. CAPOZZI Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2015, **118**(6), 1395-1408 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1111/jam.12789. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12789>
- CHIDI, B. S., D. ROSSOUW, A. S. BUICA a F. F. BAUER Determining the Impact of Industrial Wine Yeast Strains on Organic Acid Production Under White and Red Wine-like Fermentation Conditions. *South African Journal of Enology* [online]. 2015, **36**(3), 316-327 [cit. 2016-04-26]. ISSN 0253939X.
- ANTALICK, Guillaume, Marie-Claire PERELLO a Gilles DE REVEL. Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(50), 12371-12383 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1021/jf303238n. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf303238n>
- VOLSCHENK, H., H.J.J. van VUUREN a M. VILJOEN-BLOOM Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African journal for enology and viticulture / SAWWV, SASEV*. 2006, **27**(2). ISSN 0253-939x. Dostupné také z: <http://www.mendeley.com/research/malic-acid-wine-origin-function-metabolism-during-vinification/>
- SUN, Shu Yang, Han Sheng GONG, Wen Li LIU a Cheng Wu JIN. Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines. *Food Microbiology* [online]. 2016, **55**, 16-24 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.fm.2015.11.016. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002015002464>
- BIANCHI, Federica, Maria CARERI a Claudio CORRADINI. Novel approach for the rapid determination of water-soluble organic acids in wine by co-electroosmotic flow capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2005, **28**(9-10), 898-904. DOI: 10.1002/jssc.200500046. ISSN 1615-9306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500046>

- DE VILLIERS, André, Phillipus ALBERTS, Andreas G.J. TREDoux a Hélène H.
- 61] NIEUWOUDT Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **730**, 2-23. DOI: 10.1016/j.aca.2011.11.064. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011016321>
- CAMILLERI, Patrick. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 2nd ed.
- 62] Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1998, 552 p. ISBN 084939127X.
- CASTIÑEIRA, A., R.M. PEÑA, C. HERRERO a S. GARCÍA-MARTÍN Analysis of
- 63] Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002, **15**(3), 319-331. DOI: 10.1006/jfca.2002.1056. ISSN 08891575. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157502910562>
- PERES, R.G., E.P. MORAES, G.A. MICKE, F.G. TONIN, M.F.M. TAVARES a D.B.
- 64] RODRIGUEZ-AMAYA Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*. 2009, **20**(6), 548-552. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.08.004. ISSN 09567135. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002168>
- HAGBERG, Jessika. Analysis of low-molecular-mass organic acids using
- 65] capillary zone electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **988**(1), 127-133 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02022-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302020228>
- ESCARPA, Alberto, María Cristina GONZÁLEZ, Agustín González CREVILLÉN
- 66] a Antonio Javier BLASCO. CE microchips: An opened gate to food analysis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2007, **28**(6), 1002-1011 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200600412. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200600412>
- MASÁR, Marián, Katarína POLIAKOVÁ, Mariana DANKOVÁ, Dušan
- 67] KANIANSKY a Bernd STANISLAWSKI. Determination of organic acids in wine by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection. *Journal of Separation Science*

- [online]. 2005, **28**(9-10), 905-914 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/jssc.200500061. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500061>
- 68] KUBÁŇ, Pavel a Peter C. HAUSER Application of an external contactless conductivity detector for the analysis of beverages by microchip capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, **26**(16), 3169-3178 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200500178. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500178>
- 69] RYVOLOVÁ, Markéta, Jan PREISLER, František FORET, Peter C. HAUSER, Pavel KRÁSENSKÝ, Brett PAULL a Mirek MACKA. Combined Contactless Conductometric, Photometric, and Fluorimetric Single Point Detector for Capillary Separation Methods. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, **82**(1), 129-135 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1021/ac902376v. ISSN 00032700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac902376v>
- 70] FORET, Frantisek. Capillary electrophoresis of small ions using complex formation and indirect detection. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, **30**(1), 34-39 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200900004. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200900004>
- 71] ROVIO, Stella, Anna KALLIOLA, Heli SIRÉN a Tarja TAMMINEN. Determination of the carboxylic acids in acidic and basic process samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(8), 1407-1413. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.032. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309018196>
- 72] DE VILLIERS, André, Frédéric LYNEN, Andrew CROUCH a Pat SANDRA. A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, **217**(6), 535-540 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1007/s00217-003-0819-8. ISSN 14382377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0819-8>
- 73] ARELLANO, M., S. EL KADDOURI, C. ROQUES, F. COUDERC a Ph. PUIG. Capillary electrophoresis and indirect UV detection as a fast and simple analytical tool for bacterial taxonomy. *Journal of Chromatography A*. 1997, **781**(1-2), 497-501.

DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00310-5. ISSN 00219673. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967397003105>

- 74] ARELLANO, Michel, Pascal JOMARD, Said EL KADDOURI, Christine ROQUES, Françoise NEPVEU a François COUDERC. Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, **741**(1), 89-100. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00066-9. ISSN 03784347. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434700000669>

- 75] FUNG, Ying Sing a Kap Man LAU. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2003, **24**(18), 3224-3232 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200305535. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200305535>

- 76] REED, Christian. *Capillary electrophoresis (CE): principles, challenges and applications*. New York: Nova Publisher's, 2015, xiv, 322 pages. ISBN 9781634831222.

- 77] ESTEVES, Valdemar I., Susana S.F. LIMA, Diana L.D. LIMA a Armando C. DUARTE Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **513**(1), 163-167. DOI: 10.1016/j.aca.2003.12.036. ISSN 00032670. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003016623>

- 78] MATO, Inés, Silvia SUÁREZ-LUQUE a José F. HUIDOBRO Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*. 2007, **102**(1), 104-112. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.002. ISSN 03088146. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606003839>

- 79] KLAMPFL, Christian W., Martin U. KATZMAYR a Wolfgang BUCHBERGER. Separation of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect UV and conductivity detection. *Electrophoresis* [online]. 1998,

19(14), 2459-2464 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1002/elps.1150191418. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150191418>

- 80] SAENZ-LOPEZ, R., P. FERNANDEZ-ZURBANO a M.,T. TENA Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **990(1-2)**, 247-258 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02006-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730202006X>

- 81] WEINBERGER, Robert. *Practical capillary electrophoresis*. 2nd ed. San diego, CA: Academic Press, 2000, xvii, 462 p. ISBN 0127423567.

- 82] MATO, Inés, Silvia SUÁREZ-LUQUE a José F. HUIDOBRO A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*. 2005, **38(10)**, 1175-1188. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.04.007. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996905000797>

- 83] ZERAVIK, Jiri, Zdenka FOHLEROVA, Miodrag MILOVANOVIC et al.. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food Chemistry* [online]. 2016, **194**, 432-440 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.013. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011966>

- 84] SIRÉN, Heli, Kimmo SIRÉN a Juhani SIRÉN. Evaluation of organic and inorganic compounds levels of red wines processed from Pinot Noir grapes. *Analytical Chemistry Research* [online]. 2015, **3**, 26-36 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.ancr.2014.10.002. ISSN 22141812. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221418121400024X>

- 85] ATENCIA, Javier a David J. BEEBE Controlled microfluidic interfaces. *Nature*. 2005, **437(7059)**, 648-655. DOI: 10.1038/nature04163. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature04163>

- 86] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.

- Chapter 20-Miniaturization and microfluidics. FANALI, S., P.R. HADDAD, C.F.
- 87] POOLE, P. SCHOENMAKERS a D. LLOYD *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. První. Waltham: Elsevier, 2013, s. 453–467. ISBN 978-0-12-415807-8.
- RYVOLOVÁ, Markéta, Mirek MACKA, Jan PREISLER a Dermot BRABAZON.
- 88] Portable capillary-based (non-chip) capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(4), 339-353. DOI: 10.1016/j.trac.2009.12.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993610000282>
- BREADMORE, Michael C. Capillary and microchip electrophoresis:
- 89] Challenging the common conceptions. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1221**(1), 42-55. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.062. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311014385>
- SÁIZ, Jorge, Israel Joel KOENKA, Carmen GARCÍA-RUIZ, Beat MÜLLER,
- 90] Thomas CHWALEK a Peter C. HAUSER Micro-injector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2015, **36**(16), 1941-1944. DOI: 10.1002/elps.201400589. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400589>
- YASHIN, Ya. I. a A. Ya. YASHIN Miniaturization of Gas-Chromatographic
- 91] Instruments. *Journal of Analytical Chemistry*. 2001, **56**(9), 794–805. DOI: 10.1023/A:1016795926329. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016795926329>
- RUZICKA, Jaromir a Elo Harald HANSEN. Retro-review of flow-injection
- 92] analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2008, **27**(5), 390-393. DOI: 10.1016/j.trac.2008.03.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608000782>
- RUZICKA, Jaromir a Elo Harald HANSEN. Flow injection analysis: From
- 93] beaker to microfluidics. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**(5), 212-217. DOI: 10.1021/ac002756m. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac002756m>
- SHARMA, Sonika, Luke T. TOLLEY, H. Dennis TOLLEY, Alex PLISTIL, Stanley D.
- 94] STEARNS a Milton L. LEE Hand-portable liquid chromatographic instrumentation.

- Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**(1), 38-47. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.119. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315011292>
- 95] ŠESTÁK, Jozef, Dana MORAVCOVÁ a Vladislav KAHLE. Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**(1), 2-17. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.090. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731501078X>
- 96] SANDRON, S., B. HEERY, V. GUPTA et al. 3D printed metal columns for capillary liquid chromatography. *Analyst*. 2014, **139**(24), 6343-6347. DOI: 10.1039/c4an01476f. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AN01476F>
- 97] MARK, Daniel, Stefan HAEBERLE, Günter ROTH, Felix VON STETTEN a Roland ZENGERLE. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(3), 1153-1182. DOI: 10.1039/B820557B. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b820557b>
- 98] ŠESTÁK, Jozef, Filip DUŠA, Dana MORAVCOVÁ a Vladislav KAHLE. Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1276**(1), 26-32. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731201878X>
- 99] BARAM, G.I., M.A. GRACHEV, N.I. KOMAROVA, M.P. PERELROYZEN, Yu.A. BOLVANOV, S.V. KUZMIN, V.V. KARGALTSEV a E.A. KUPER. Micro-column liquid chromatography with multi-wave-length photometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1983, **264**(1), 69-90. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95007-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301950071>
- 100] BARAM, G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories I. *Aims. Journal of Chromatography A*. 1996, **728**(1-2), 387-399. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01271-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395012710>
- 101] BORING, C.Bradley, Purnendu K DASGUPTA a Anna SJÖGREN. Compact, field-portable capillary ion chromatograph. *Journal of Chromatography A*. 1998,

- 804**(1-2), 45-54. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00139-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398001393>
- KIPLAGAT, Isaac K., Petr KUBÁŇ, Pavlína PELCOVÁ a Vlastimil KUBÁŇ.
- 102] Portable, lightweight, low power, ion chromatographic system with open tubular capillary columns. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(31), 5116-5123. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.06.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310007697>
- SHARMA, Sonika, Alex PLISTIL, Robert S. SIMPSON, Kun LIU, Paul B.
- 103] FARNSWORTH, Stanley D. STEARNS a Milton L. LEE Instrumentation for hand-portable liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1327**(1), 80-89. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.059. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313019407>
- SHARMA, Sonika, H. Dennis TOLLEY, Paul B. FARNSWORTH a Milton L. LEE
- 104] LED-Based UV Absorption Detector with Low Detection Limits for Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(2), 1381-1386. DOI: 10.1021/ac504275m. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504275m>
- ELKIN, Kyle R. Portable, fully autonomous, ion chromatography system for
- 105] on-site analyses. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1352**(1), 38-45. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.046. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314008127>
- FANALI, Chiara, Laura DUGO, Paola DUGO a Luigi MONDELLO. Capillary-
- 106] liquid chromatography (CLC) and nano-LC in food analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **52**(1), 226-238. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361300188X>
- SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN *Introduction to modern*
- 107] *liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.

- WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006, **442**(7101), 368-373. DOI: 10.1038/nature05058. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05058>
- DIFFEY, Brian L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*. 2002, **28**(1), 4-13. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00204-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202302002049>
- Crystal IS* [online]. USA: Crystal IS, 2015 [cit. 2016-08-17]. Dostupné z: <http://www.cisuvc.com/>
- SHATALOV, M., A. LUNEV, X. HU et al. PERFORMANCE AND APPLICATIONS OF DEEP UV LED. *International Journal of High Speed Electronics and Systems*. 2012, **21**(1), 125011-1-125011-15. DOI: 10.1142/S0129156412500115. Dostupné také z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129156412500115>
- SHIN, Joo-Yeon, Soo-Ji KIM, Do-Kyun KIM, Dong-Hyun KANG a C. A. ELKINS Fundamental Characteristics of Deep-UV Light-Emitting Diodes and Their Application To Control Foodborne Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(1), 2-10. DOI: 10.1128/AEM.01186-15. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01186-15>
- KIM, Soo-Ji, Do-Kyun KIM, Dong-Hyun KANG a J. L. SCHOTTEL Using UVC Light-Emitting Diodes at Wavelengths of 266 to 279 Nanometers To Inactivate Foodborne Pathogens and Pasteurize Sliced Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(1), 11-17. DOI: 10.1128/AEM.02092-15. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02092-15>
- DASGUPTA, Purnendu K, In-Yong EOM, Kavin J MORRIS a Jianzhong LI. Light emitting diode-based detectors. *Analytica Chimica Acta*. 2003, **500**(1-2), 337-364. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00575-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003005750>
- MACKA, Mirek, Tomasz PIASECKI a Purnendu K. DASGUPTA Light-Emitting Diodes for Analytical Chemistry. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2014, **7**(1), 183-207. DOI: 10.1146/annurev-anchem-071213-020059. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-anchem-071213-020059>

- BUI, Duy Anh a Peter C. HAUSER Analytical devices based on light-emitting diodes – a review of the state-of-the-art. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **853**(1), 46-58. DOI: 10.1016/j.aca.2014.09.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014011702>
- VACULOVIČOVÁ, Markéta, Mahbub AKTHER, Pleun MAASKANT, Dermot BRABAZON a Mirek MACKA. Fibre coupled micro-light emitting diode array light source with integrated band-pass filter for fluorescence detection in miniaturised analytical systems. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **871**(1), 85-92. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015002226>
- KRČMOVÁ, Lenka, Anna STJERNLOF, Sebastien MEHLEN, Peter C. HAUSER, Silvija ABELE, Brett PAULL a Mirek MACKA. Deep-UV-LEDs in photometric detection: A 255 nm LED on-capillary detector in capillary electrophoresis. *Analyst*. 2009, **134**(12), 2394-2396. DOI: 10.1039/b916081g. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b916081g>
- JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA a Paul R. HADDAD Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*. 2004, **25**(18-19), 3145-3152. DOI: 10.1002/elps.200405913. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200405913>
- ROHRBASSER, Claude, Dominique RHÊME, Sylvain DÉCASTEL, Samuel ROTH, Maria de Lourdes Aja MONTES, Jean-Luc VEUTHEY a Serge RUDAZ. A New Capillary Electrophoresis Device with Deep UV Detector Based on LED Technology. *Chimia*. 2009, **93**(12), 890-891. DOI: 10.2533/chimia.2009.890. Dostupné také z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- SCHMID, Stefan, Mirek MACKA a Peter C. HAUSER UV-absorbance detector for HPLC based on a light-emitting diode. *Analyst*. 2008, **133**(4), 465-469. DOI: 10.1039/b715681b. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b715681b>
- BOMASTYK, Benjamin, Igor PETROVIC a Peter C. HAUSER Absorbance detector for high-performance liquid chromatography based on light-emitting

diodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(24), 3750-3756. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.039. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311005383>

- 123] BUI, Duy Anh, Benjamin BOMASTYK a Peter C. HAUSER Absorbance detector based on a deep UV light emitting diode for narrow-column HPLC. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(19), 3152-3157. DOI: 10.1002/jssc.201300598. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300598>

- 124] BUI, Duy Anh a Peter C. HAUSER Absorbance detector for capillary electrophoresis based on light-emitting diodes and photodiodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**, 203-208. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.06.005. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315008213>

- 125] HIRAYAMA, Hideki, Sachie FUJIKAWA a Norihiko KAMATA. Recent Progress of AlGa_N-based Deep-UV LEDs. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems*. 2013, **133**(8), 1443-14482. DOI: 10.1541/ieejeiss.133.1443. Dostupné také z: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/ieejeiss/133.1443?lang=en>

- 126] HIRAYAMA, Hideki, Sachie FUJIKAWA, Norimichi NOGUCHI, Jun NORIMATSU, Takayoshi TAKANO, Kenji TSUBAKI a Norihiko KAMATA. 222-282 nm AlGa_N and InAlGa_N-based deep-UV LEDs fabricated on high-quality AlN on sapphire. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*. 2009, **206**(6), 1176-1182. DOI: 10.1002/pssa.200880961. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pssa.200880961>

- 127] SUN, Pai, Xianglong BAO, Songqing LIU, Chunya YE, Zhaorong YUAN, Yukun WU, Shuping LI a Junyong KANG. Advantages of AlGa_N-based deep ultraviolet light-emitting diodes with a superlattice electron blocking layer. *Superlattices and Microstructures*. 2015, **85**(1), 59-66. DOI: 10.1016/j.spmi.2015.05.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749603615002694>

- 128] HELAVA, Heikki, Tat'jana CHEMEKOVA, Oleg AVDEEV, Eugeny MOKHOV, Sergey NAGALYUK, Yuri MAKAROV a Mark RAMM. AlN substrates and epitaxy results. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics*. 2010, **7**(7-8),

- 2115-2117. DOI: 10.1002/pssc.200983619. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/pssc.200983619>
- 129] CHYI, Jen-Inn, Hiroshi FUJIOKA, Hadis MORKOÇ et al.. High-efficiency UV LEDs on sapphire. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. 2015, **9363**(1), 93631-1-93631-7. DOI: 10.1117/12.2079874. Dostupné také z:
<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2079874>
- 130] NORIMICHI, Noguchi, Hideki HIRAYAMA, Tohru YATABE a Norihiko KAMATA. 222 nm single-peaked deep-UV LED with thin AlGaIn quantum well layers. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics*. 2009, **6**(2), 459-461. DOI: 10.1002/pssc.200880923. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/pssc.200880923>
- 131] GASKA, Ignas, Olga BILENKO, Saulius SMETONA, Yuri BILENKO, Remis GASKA a Michael SHUR. Deep UV LEDs for Public Health Applications. *International Journal of High Speed Electronics and Systems*. 2014, **23**(3-4), 1450018-1-1450018-10. DOI: 10.1142/S0129156414500189. Dostupné také z:
<http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129156414500189>
- 132] DICKENS, Jason E., Michael S. VAUGHN, Mervin TAYLOR a Mike PONSTINGL. An LED array-based light induced fluorescence sensor for real-time process and field monitoring. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2011, **158**(1), 35-42. DOI: 10.1016/j.snb.2011.04.077. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400511003741>
- 133] KHIZAR, M., Z. Y. FAN, K. H. KIM, J. Y. LIN a H. X. JIANG Nitride deep-ultraviolet light-emitting diodes with microlens array. *Applied Physics Letters*. 2005, **86**(17), 1-3. DOI: 10.1063/1.1914960. Dostupné také z:
<http://scitation.aip.org/content/aip/journal/apl/86/17/10.1063/1.1914960>
- 134] HOLLINGTON, D, J T BAIRD, T J SUMNER a P J WASS. Characterising and testing deep UV LEDs for use in space applications. *Classical and Quantum Gravity*. 2015, **32**(23), 235020-1-235020-19. DOI: 10.1088/0264-9381/32/23/235020.

- Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0264-9381/32/i=23/a=235020?key=crossref.a0c9b2592e8a20aaf4f82298c28b372a>
- 135] HUANG, Jian-Jang, Hao-Chung KUO a Shyh-Chiang SHEN. *Nitride Semiconductor Light-Emitting Diodes (LEDs)*. První. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing Limited, 2014. ISBN 978-0857095077.
- 136] MACKA, Miroslav, Per ANDERSSON a Paul R. HADDAD Linearity evaluation in absorbance detection: The use of light-emitting diodes for on-capillary detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1996, **17**(12), 1898-1905. DOI: 10.1002/elps.1150171215. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150171215>
- 137] HIRAYAMA, H. Ultraviolet LEDs. *Nitride Semiconductor Light-Emitting Diodes (LEDs): Materials, Technologies and Applications*. 2013, , 497-532. DOI: 10.1533/9780857099303.3.497. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857095077500173>
- 138] DVOŘÁKOVÁ, Irena. *Analýza kaseinů kravského mléka kapilární elektroforézou*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- 139] ŠURANSKÁ, Hana. *Izolace, identifikace a charakterizace mikroflóry vína a vybraných potravin*. Brno, 2014. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- 140] KRČMOVÁ, Lenka, Anna STJERNLOF, Sebastien MEHLEN, Peter C. HAUSER, Silvija ABELE, Brett PAULL a Mirek MACKA. Deep-UV-LEDs in photometric detection: A 255 nm LED on-capillary detector in capillary electrophoresis. *Analyst*. 2009, **134**(12), 2394-2396. DOI: 10.1039/b916081g. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b916081g>
- 141] JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA a Paul R. HADDAD Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*. 2004, **25**(18-19), 3145-3152. DOI: 10.1002/elps.200405913. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200405913>

- JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA, Paul R. HADDAD, Marion KING a Brett PAULL. Practical method for evaluation of linearity and effective pathlength of on-capillary photometric detectors in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2001, **927**(1-2), 237-241. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01095-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301010950>
- 142]
- ČAPKA, Lukáš, Zbyněk VEČEŘA, Pavel MIKUŠKA, Jozef ŠESTÁK, Vladislav KAHLE a Alena BUMBOVÁ. A portable device for fast analysis of explosives in the environment. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1388**(1), 167-173. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.041. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315002988>
- 143]
- SHARMA, Sonika, H. Dennis TOLLEY, Paul B. FARNSWORTH a Milton L. LEE LED-Based UV Absorption Detector with Low Detection Limits for Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(2), 1381-1386. DOI: 10.1021/ac504275m. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504275m>
- 144]
- BOMASTYK, Benjamin, Igor PETROVIC a Peter C. HAUSER Absorbance detector for high-performance liquid chromatography based on light-emitting diodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(1), 3750–3756. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.039. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311005383>
- 145]
- HOLLINGTON, D, J T BAIRD, T J SUMNER a P J WASS. Characterising and testing deep UV LEDs for use in space applications. *Classical and Quantum Gravity*. 2015, **32**(1), 1-19. DOI: 10.1088/0264-9381/32/23/235020. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0264-9381/32/i=23/a=235020?key=crossref.a0c9b2592e8a20aaf4f82298c28b372a>
- 146]
- PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 2011, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- 147]
- FEARON, Anna M, C Sinclair MAYNE, J Alan M BEATTIE a David W BRUCE. Effect of level of oil inclusion in the diet of dairy cows at pasture on animal
- 148]

performance and milk composition and properties. *Nature* [online]. 2004 [cit. 2016-06-21]. DOI: 10.1002/jsfa.1714. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1714>

- 149] GRUMMER, R.R., M.L. LUCK a J.A. BARMORE Lactational performance of dairy cows fed raw soybeans, with or without animal by-product proteins, or roasted soybeans. *Journal of Dairy Science*. 1994, **77**(5), 1354-1359.

- 150] MURPHY, J.J., J.F. CONNOLLY a G.P. MCNEILL Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Livestock Production Science*. 1995, **44**(1), 1-11. DOI: 10.1016/0301-6226(95)00049-Q. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030162269500049Q>

- 151] MIČÍKOVÁ, Ivana. *Stanovení kaseinů kapilární elektroforézou*. Brno, 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

- 152] MICHALCOVÁ, A. a Z. KRUPOVÁ Influence of composite κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on composition, rennetability and heat stability of milk of cows of Slovak Pied breed. *Czech Journal of Animal Science*. 2007, **52**(9), 292-298.

- 153] GEJDOŠOVÁ, Lucie. *Stanovení kaseinových frakcí v kravském mléce*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

9 ŽIVOTOPIS AUTORA

Ing. Miloš Dvořák

Kontakt:

Trvalé bydliště: Na Ohradě 432/37, 392 01 Soběslav II

Telefon 777 970 281

E-mail mil.dvorak@seznam.cz

K zastižení na Fakultě chemické VUT v Brně, Purkyňova 118, Brno 612 00,
telefon 541 14 9425 (kancelář) a 541 14 9355 (laboratoř), dvorak@fch.vut.cz

Narozen: 10.2.1984 v Táboře, ČR

Státní příslušnost: česká

Vzdělání:

- 2000 – 2004 – SOŠ pro ochranu a tvorbu životního prostředí, Veselí nad Lužnicí, obor: **Analýza potravin**, ukončeno maturitou s vyznamenáním
- 2004 – 2009 – Fakulta chemická VUT Brno:
bakalářský program (**Potravinářská chemie**)
Bakalářská práce: *Vzorkování a odběry potravinářských vzorků*

magisterský program (**Potravinářská chemie a biotechnologie**)

ukončeno státní zkouškou a obhajobou diplomové práce – titul „Ing.“

Diplomová práce: *Posouzení aplikovatelnosti nepřímé fotometrické detekce k chirálním separacím vybraných karboxylových kyselin v mlékárenských výrobcích*

- 2009 – dosud – prezenční a kombinované doktorské studium, Fakulta chemická VUT Brno, Ústav chemie potravin a biotechnologií, program **Potravinářská chemie**
- Státní doktorská zkouška složena 20.9.2012.

Téma pojednání k dizertační práci: *Aplikace kapilárních elektromigračních metod na stanovení organických kyselin a kaseinů, jako biotechnologicky významných složek potravinářského průmyslu*

Téma dizertační práce: *Využití kapilárních elektromigračních metod při analýze kyseliny mléčné a dalších produktů fermentace.*

(Plánovaná obhajoba Ph.D. do konce roku 2016)

Dosavadní praxe a pracovní zkušenosti:

- **v rámci střední školy** – v mlékárenských a mikrobiologických laboratořích potravinářských podniků
- v rámci bakalářského studia – praxe na SZPI Tábor
- **v roce 2009** – pracovní stáž v USA po dobu 4 měsíců (program WAT)
- **v rámci DSP studia** – zapojení do aktivit fakulty a řady projektů (viz přehled aktivit), školení a krátkodobé stáže související s tématem disertace

- **říjen 2013 – květen 2015** – zahraniční stáž v prestižním výzkumném centru pro separační vědy „ACROSS“ na University of Tasmania – Tasmánie, Austrálie – podílení se na výzkumu v oblasti přenosné, miniaturizované analytické instrumentace

- **červen 2015 – dosud** – laboratorně – technický pracovník pro biotechnologii – Centrum materiálového výzkumu (CMV) FCH VUT v Brně
- **říjen 2015 – dosud** – Junior researcher – výzkumný pracovník pro biotechnologie a analýzu biomateriálů – v sekci Laboratoře biotechnologie a biomateriálů CMV FCH VUT v Brně
- **únor 2016 – dosud** – technický pracovník pro vývoj biotechnologie Hydal – CMV FCH VUT v Brně

Jazykové dovednosti:

- německý jazyk – základní úroveň (čteným a psaným slovem)
- anglický jazyk – pokročilejší – komunikační úroveň (čtené, psané i mluvené slovo).

Ostatní dovednosti:

- Práce s počítači (HW/SW) a standardními počítačovými programy na pokročilé úrovni.
- Řidičský průkaz skupiny B.
- Zkušenosti s organizací a vedením menších neziskových společností (zaměření na kulturu, správu a vedení společenství domů), daňové a administrativní práce, správa nemovitostí, zkušenosti s vedením podvojného účetnictví včetně daňových uzávěrek (10 let).
- Zájmy: turistika, country tance (působení i jako lektor), organizační aktivity – spolupořadatel a odpovědný řešitel oblastních soutěžních kol a festivalů spojených s hudebním děním na české scéně (folk-country, tramp, sdružení Porta...).
- Zkušenosti a zájem o technické-přístrojové provedení rozličných instrumentálních analytických technik z hlediska servisu, zapojení, vnitřního fungování a údržby, doprovázeno praktickými dovednostmi.
- Schopnost většího pracovního nasazení, nekonfliktnost, ochota učit se a zkoušet nové věci.
- Zdravotní stav – dobrý, schopný práce v chemických laboratořích.
- Rodinný stav – svobodný, bezdětný.

Reference

Reference na mou osobu je možné získat

- a) na Vysokém učení technickém v Brně – Fakulta Chemická – ústav Chemie potravin a biotechnologií u **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.** (vespalcova@fch.vutbr.cz, +420 54114 9417).
- b) na University of Tasmania – School of Physical Sciences Australian, Centre for Research on Separation Science (ACROSS) u **Prof Mirek Macka, Ph.D.** (mirek.macka@utas.edu.au, +61459700257)

Vybrané reference (publikace, účast na projektech,...) lze ověřit na oficiálních webových stránkách VUT v Brně na osobní vizitce: <http://www.vutbr.cz/lide/milos-dvorak-86465>

Přehled vědecké aktivity + zkušenosti

Dosavadní projekty:

- V akademickém roce 2010/2011: projekt FRVŠ – 1785/2011 – Nové úlohy v Praktiku z instrumentální a strukturní analýzy – účast jako **spoluřešitel** (zavedení nových elektromigračních a chromatografických metod)
- 1.1.2012 – 31.12.2012: projekt z programu „Výzkum a věda pro život 2011“, financovaný z výnosů částek poskytnutých NIF, Nadace Tomáše Bati – „Vývoj a aplikace účinných elektromigračních metod pro vinařské, mlékárenské a biotechnologické potřeby.“ – účast jako **samostatný žadatel i řešitel**
- V akademickém roce 2010/2011: projekt Vývoj nového moderního biotechnologického postupu umožňujícího účinnější způsob využívání odpadních vod z mlékárenského průmyslu jako materiálového zdroje pro výrobu vodíku., zahájení: 01.03.2008, ukončení: 31.12.2011 MŠMT, 2B08070. Získání zkušeností z oblasti plynové chromatografie, prací s anaerobními podmínkami pro kultivace, vývoj nových kultivačních laboratorních sestav vhodných zároveň pro kultivace i odběry pro plynovou chromatografii. – **účast na laboratorním řešení projektu**
- 01.06.2015-31.12.2015: projekt Zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi bakterií (GAČR) – **člen řešitelského týmu**
- 01.02.2016-31.12.2016: projekt Transfer biotechnologie Hydal do Číny (TAČR) – **člen řešitelského týmu**

Významné odborné zkušenosti se separačními analytickými instrumentacemi:

- Na pokročilé úrovni – **elektromigrační metody** (kapilární elektroforéza – vývoj, aplikace metod a rutinní analýzy. Zkušenosti s několika různými instrumentacemi od různých výrobců (Agilent, PrinCE Technologies, „home-made“ sestavy i jednoúčelové analyzátory) a různými ovládacími a vyhodnocovacími programy (CSW, Clarity, SW Agilent, WPrinCE). Užívání UV-VIS detekce, PAD detekce, práce s různými separačními i detekčními módy (př. pokryté nepokryté kapiláry, přímá i nepřímá detekce). Analýzy organických kyselin, bílkovin (kaseinů), částečně chirální separace. Tyto metody jsou nosnou problematikou doktorské práce a dílčí výsledky byly publikovány na řadě posterů (viz.přehled publikací). Zvládnutá částečná znalost servisování a obsluhy přístrojů na vyšší úrovni (zvládání lehčích oprav, jednání a postup dle pokynů servisu). Znalost využití simulačních PC programů pro CE (PeakMaster, Simul).
- Na pokročilejší úrovni – **plynová chromatografie** – zkušenosti s různými typy GC přístrojů starších typů Hewlett-Packard a Chrom V, včetně jejich servisu, představování a modifikace na konkrétní požadavky. Na GC vývoj a aplikace metod i rutinního užívání analýz mastných kyselin, alkoholů a vybraných plynů s užitím detektorů tepelně vodivostních a plamenoionizačních. Zkušenosti i s náplňovými kolonami, orientace v typech fází, zkušenost s náplněmi adsorpčními (sorbenty) i molekulovými sítě. V rámci GC problematiky byla vyvinuta speciální aparatura pro anaerobní kultivace. V důsledku methanolové aféry byla vyvinuta snadná, rychlá, screeningová metoda stanovení nižších alkoholů v nápojích.
- Na pokročilé úrovni – **kapalinová chromatografie**, s UV-VIS a refraktometrickou detekcí. Účast na servisování různých typů přístrojů, zkušenost ze zapojením komponent, částečná asistence na vývoji metody a aplikacích (analýzy stanovení cukrů, ethanolu, polyfenolických látek). Soustředění se v rámci výzkumné stáže na Univesity of Tasmania na vývoj miniaturizovaného modulárního kapalinového chromatografu (publikováno). Zkušenosti s miniaturizovanými typy detekcí (optických a elektrochemických) pro přenosný modulární kapalinový chromatograf.

Pedagogická praxe – výuka:

- Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy – osoba odpovědná za úlohy z oblasti elektromigračních separací
- Praktikum z biotechnologie
- Praktikum z bioinženýrství
- Laboratoř oboru II – vedení vybraných cvičení v Diplomovém semináři
- Cvičení z biotechnologie I
- Oponent vybraných bakalářských prací
- Asistence při vedení diplomantů a bakalářů při praktické části jejich závěrečných prací (navrhování experimentů dohled nad provedením)

Absolvované Významné semináře a kurzy

- únor 2009 – školení interních auditorů systémů HACCP a norem ISO 9001.
- 2. - 4.5.2011 - Česká chromatografická škola - HPLC 2011, Seč, Česká republika: kurz separačních technik (HPLC, CZE, GC).
- 9. - 11.5.2011 - Vzorkování 2011, Valtice, Česká republika: kurs zaměřený na vzorkování rozličných materiálů.
- 19. - 22.9.2011 - Kurs základů vědecké práce, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno, ČR: kurs zaměřený na techniky a metodiku vědecké práce.
- květen, 2016 – školení na obsluhu tlakových nádob (stále platné)
- únor – květen 2010 a 2012 – přednášky z moderní instrumentální analýzy. Brno, pořadatel Akademie věd. Náplň moderní analytické metody, postupy a trendy.
- 2.10.2012 – Rychlé separační metody ve farmaceutické analýze . Vývoj LC metod od A do Z. Praha, pořadatel Česká chromatografická škola.(techniky HPLC, GC, CE)
- celkem cca za 2010 – 2013 absolvováno 27 odborných seminářů a kursů (podrobný výpis je možno na vyžádání předložit – tematicky jsou to:
Kurzy možnosti financování výzkumu z fondů ČR i EU, duševního vlastnictví, autorského práva, patentového řízení a vlastnictví, patentových řešerů, publikování v odborných časopisech, kurzy spolupráce mezi vysokými školami a podniky, podnikové strategie a tvorby projektů, zadávání veřejných zakázek, sestavení podnikatelského plánu, základy plánování a řízení rentabilního výzkumu, základy inovačních procesů, plánování a řízení projektů, přenos výsledků výzkumu a vývoje do praxe,
- Z odborné instrumentálně-analytické praxe šlo o absolvování seminářů a kursů týkající se analytických separačních metod a přípravy vzorků, volby instrumentace, její metodiky a nových trendů. Zejména šlo o firemní semináře Sigma-Aldrich, Schimadzu, HPST (Agilent Technologies), Labicom, Mettler Toledo, Chromservis, Pragolab, Kinetex. Vše zaměřeno na chromatografické a elektroforetické metody (GC, HPLC, CE). Možno doložit certifikáty o účasti. Absolvovány i semináře a přednášky týkající se optimalizací, validace, metrologie a statistického zpracování analytických metod.
- Zapojení se a přispívání na portál zajišťující spolupráci mezi akademickou sférou a průmyslem (www.chempoint.cz), účast na workshopech tohoto projektu, tvorba mediálních podpor laboratorních instrumentálních technik pro tento portál

10 PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA

Impaktované publikace a publikace v databázích Scopus, nebo Web of Science –

YAN, L. ;**DVOŘÁK, M**; NESTERENKO, N., P.; STANLEY, R.; NUCHTAVORN, N.;KUJOVSKÁ-KRČMOVÁ, L.; AUFARTOVÁ, J.;MACKA, M. Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 2015, roč. 896, č. 1, s. 166-176. ISSN: 0003-2670.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Screening of potencial use of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometric detection for the monitoring of selected organic acids in fruit wine, and culture media for microbiological and biotechnological purposes. In CECE 2012. Brno: Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., 2012. s. 341-343. ISBN: 978-80-904959-1- 3.

https://www.vutbr.cz/vyzkum-a-vyvoj/vysledky?vav_id=74566 - [vysledek-74566](#)**DVOŘÁK, M.**; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. DEVELOPMENT OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD FOR MONITORING OF SELECTED ORGANIC ACIDS IN FERMENTED FOODS. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1021 (s1021 s.)ISSN: 0009- 2770.

CHROBOKOVÁ, M.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; GREGUŠOVÁ, B.; TURKOVÁ, K.;**DVOŘÁK, M.** Fermentative hydrogen production by bacterial strain *Clostridium tyrobutyricum* S5. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1014 (s1014 s.) ISSN: 0009- 2770.

Ústní prezentace

2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka; Portable capillary LC as a flexible design modular system based on a microfluidic platform and designed with off-the-shelf components; HPLC 2015, Geneva Switzerland

Yan Li, **Miloš Dvorak**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Nantana Nuchtavorn, Lenka Krčmová, Mirek Macka; *On-site and In-vivo Instrumentation and Applications*; Pacificchem 2015, Honolulu Hawaii, USA, 15-20 December 2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Nantana Nuchtavorn, Lenka Krčmová, Mirek Macka; *Portable LC: An 'open-platform' flexible modular capillary system based on a microfluidic platform and off-the-shelf components*, ISSS 2015, Ljubljana, Slovenia, 30 June – 5 July 2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka; Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components, 23rd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2015, Monday 7th December, University of Melbourne, Melbourne

DVOŘÁK, M.;YAN, L.;NUCHTAVORN, N.;NESTERENKO, N., P.;MACKA, M. Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices. *Studentská odborná konference Chemie je život 2015 Sborník abstraktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 79-79. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

DVOŘÁK, M.;YAN, L.;NUCHTAVORN, N.;NESTERENKO, N., P.;MACKA, M. Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices. *Studentská odborná konference Chemie je život 2015 Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 319-321. ISBN: 978-80-214-5290- 6.

2014

Mirek Macka, Pornpan Prapatpong, **Miloš Dvořák**, Yan Li, Petr Smejkal, Michael C. Breadmore, and Rosanne M. Guijt; *Low entry barrier microfluidics: a dream?* Analytix, Dalian China 2014,

Miloš Dvořák, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Yan Li, Mirek Macka, *Microfluidics meets Portable LC*, 5 th Australia and New Zealand Nano/Microfluidics Symposium & Workshop, Hobart, 14-16 April 2014, Short Talk, 16 April 2014.

Mirek Macka, **Miloš Dvořák**, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Yan Li, *Portable Capillary LC: A Modular Medium Pressure System Designed with off-the-Shelf Components*, Proc 38 th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, 18-23 May 2014, oral presentation.

Miloš Dvořák; *Low Cost and Rapid Bioanalytical Instrumentation and Methods used in Food Bioanalysis*; ACROSS gathering, Australian Centre for Research on Separation Sciences Annual Meeting July 24-25th 2014, Hobart Function and Conference Centre, Hobart, Tasmania, Australia.

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; *Portable capillary LC: A modular medium pressure system based on a microfluidic platform and designed with off-the-shelf components*; In Book of proceedings 20th International Symposium on Separation Science ISSS 2014, Pardubice Radanal. 2014, August 30 - September 2, 2014, Prague.

Mirek Macka, Nantana Nuchtavorn, Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, *Miniaturized portable analysis and sample preparation: Synergies?*, 1st Caparica Sample Treatment Conference 2014, Lisbon, 8 – 12 December 2014, invited plenary talk.

2012

DVOŘÁK, M.; GREGUŠOVÁ, B.; ŠURANSKÁ, H.; TURKOVÁ, K.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Optimization of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometry detection for monitoring of selected organic acid in biotechnological processes. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2012 - Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 271-275. ISBN: 978-80-214-4644-1.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B.; GREGUŠOVÁ, B.; DUBSKÝ, H. Development of laboratory equipment for cultivation of anaerobic microorganisms in inert atmosphere enabling capturing and sampling of gas and cultivation media. *Studentská odborná konference Chemie a společnost 2011/12 - Sborník příspěvků*. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická. 2012. p. 59 - 63. ISBN 978-80-214-4425-6.

2010

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. *Analysis of casein content in cow milk*. Studentská odborná konference Chemie a společnost 2010 - Sborník příspěvků. 1. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická, 2010. s. 115-120. ISBN: 978-80-214-4212-2.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; DVOŘÁKOVÁ, I.; MIČÍKOVÁ, I.; KRÍŽOVÁ, L. *Obsah kaseinů v kravském mléce v závislosti na složení krmiva*. 2010. Lékařská Fakulta, Masarykova univerzita, Studentská konference, soutěžní prezentace

2009

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. Evaluation of applicability of indirect photometric detection for chiral separations of selected carboxylic acids in dairy products. STUDENTSKÁ ODBORNÁ KONFERENCE CHEMIE A SPOLEČNOST 2009 Sborník příspěvků. 1. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2009. s. 54-54. ISBN: 978-80-214-3555-1.

Posterové prezentace

2014

Miloš Dvořák, Yan Li, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary LC Designed as a Modular System using Off-the-Shelf Components*, Proc. 38 th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, 18-23 May 2014, poster presentation No.425

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary Liquid Chromatography Using Off-The-Shelf Components Based on a Modular Microfluidic System*, 20th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2014, Prague, 30 August - 5 September **2014**, poster presentation

Miloš Dvořák, Yan Li, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *The Potential of a Portable Modular Medium Pressure Liquid Chromatography System for In-Field Food Analysis*, 14 th International Nutrition and Diagnostics Conference INDC 2014, Prague, 2-5 September 2014, poster presentation No. P167

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary Liquid Chromatography Using Off-The-Shelf Components Based on a Modular Microfluidic System*, 20th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2014, Prague, 30 August - 5 September 2014, poster presentation

Miloš Dvořák, Yan Li, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Mirek Macka; *New High Power Deep UV LED For Portable Analytical Devices*, 22nd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2014, 13-15 December 2014, Flinders University, Adelaide, South Australia

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; *Portable moderate pressure capillary liquid chromatography based on a modular microfluidic system using off-the-shelf components*, 22nd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2014, 13-15 December 2014, Flinders University, Adelaide, South Australia, Australia

2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; *Portable medium pressure capillary liquid chromatography based on a modular microfluidic system using off-the-shelf components*. *TECHNICAL PROGRAM AGENDA OF SESSIONS ABSTRACT PDF*. New Orleans, LA, USA: The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Inc., 2015. s. 1209-1209.

Miloš Dvořák, Yan Li. Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Mirek Macka; *New generation deep-UV LED for portable robust low cost optical detection in microfluidic and miniaturised analysis*. *ANZNMF 2015 Program Schedule*. Melbourne, Victoria, Australia: 6TH Australia and New Zealand Nano and Microfluidic Symposium, Melbourne Centre for Nanofabrication, 31 MARCH – 2 APRIL 2015., MELBOURNE, VICTORIA, AUSTRALIA, s. 18-18. (oceněno první cenou v poster sekci)

DVOŘÁK, M.; YAN, L.; NUCHTAVORN, N.; NESTERENKO, N., P.; MACKA, M. New generation of Deep-UV-LEDs incorporated in portable robust low cost detectors for microfluidic and miniaturised analysis. In *CECE 2015 12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, v. v. i., Brno, Czech Republic, 2015. s. 112-115. ISBN: 978-80-904959-3- 7.

2011

GREGUŠOVÁ, B.; **DVOŘÁK, M.**; DUBSKÝ, H.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. Production of carboxylic acids by different strains of Clostridium. In *International Conference Applied Natural Sciences 2011 Papiernička - Částá, October 5 - 7 PROCEEDINGS*. Trnava: University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, 2011. s. 325-329. ISBN: 978-80-8105-266-8.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. *DETERMINATION OF MILK ALBUMINS - CASEINS IN DIFFERENT TYPE OF MILKS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD*. 11th International Nutrition & Diagnostics Conference, Abstract Book and Final Programme August 28 - 31. 2011. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. s. 105-105. ISBN: 978-80-7395-378- 2.

GREGUŠOVÁ, B.; **DVOŘÁK, M.**; DUBSKÝ, H.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. *Clostridia from late-blowing cheese: Is the carboxylic acid production species-dependent?*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 70-70. ISBN: 978-80-210-5594- 0.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; KŘÍŽOVÁ, L. Using of Capillary Electromigration Methods for Determination of Impact of Cows Diet Composition on the Production and Milk Caseins. ISEKI_ FOOD 2011 Bridging Training and Research for Industry and the Wider Community. první. Milano, Itálie: Escola Superior de Biotecnologia, Universita Católica Portuguesa, 2011. s. 169-169. ISBN: 978-88-9059-890- 6.

2010

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. Vývoj metody pro stanovení kontaminujícího enantiomeru kyseliny mléčné v mléčných výrobcích. *Sborník příspěvků XXXVII. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, 2010, roč. 40, č. 1, s. 96-98. ISSN: 1802- 1433.

Diplomová a bakalářská práce:

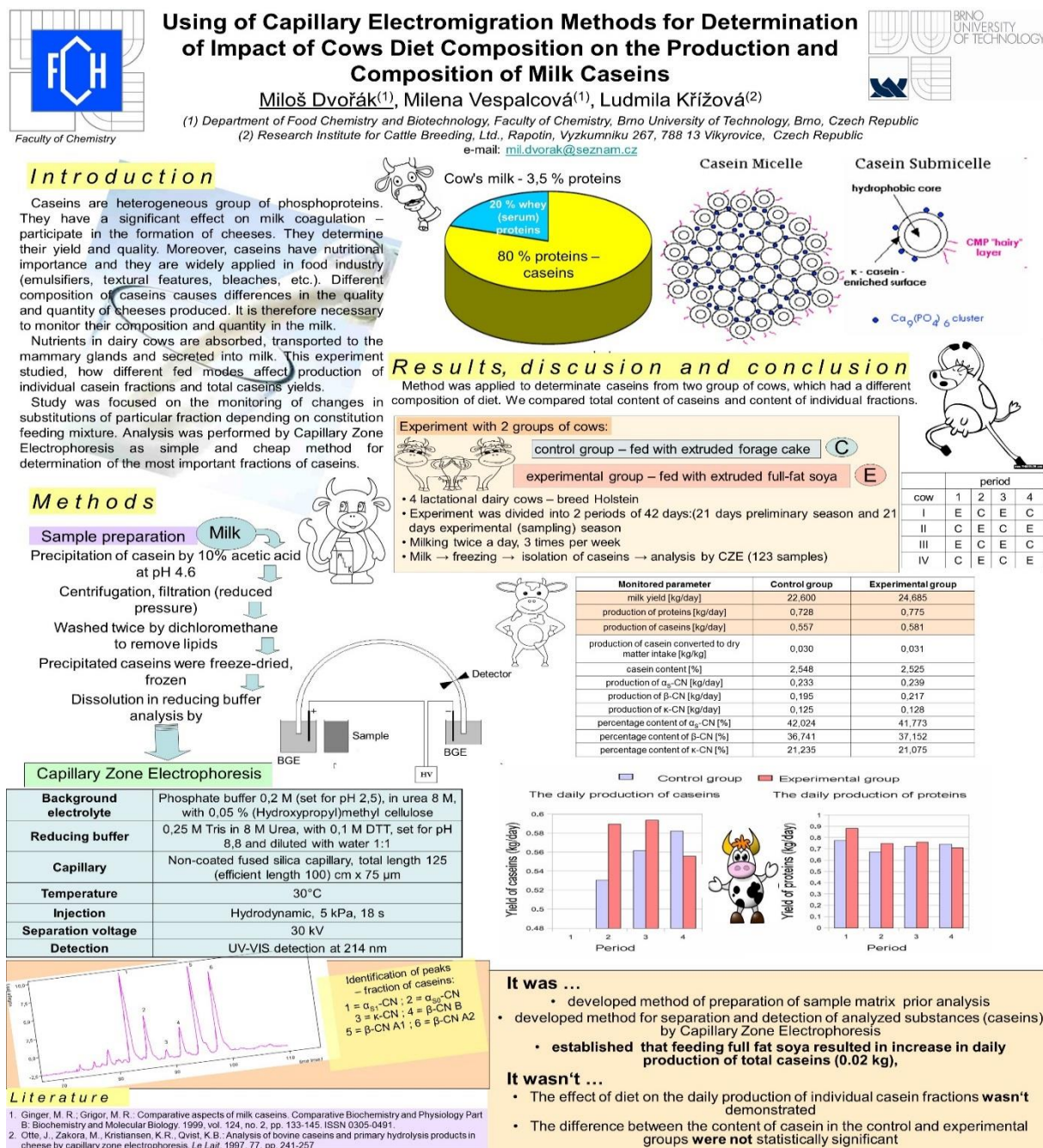
DVOŘÁK, M. Posouzení aplikovatelnosti nepřímé fotometrické detekce k chirálním separacím vybraných karboxylových kyselin v mlékárenských výrobcích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 44 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

DVOŘÁK, M. *Vzorkování a odběry potravinářských vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 35 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

11 PLNÉ ZNĚNÍ (XEROKOPIE) VYBRANÝCH PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

11.1 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu kaseinových frakcí

Plakátové sdělení na zahraniční konferenci ISEKI, Miláno, Itálie, 2011. Publikován příspěvek v recenzovaném sborníku a poster:



11.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Recenzovaný rozšířený abstrakt prošel recenzním řízením a poster byl prezentován na konferenci CECE 2013 v Brně. Rozšířený abstrakt publikován v impaktovaném časopise.

Chem. Listy 107, s360 s361 (2013)

CECE Junior 2013

Posters

MONITORING OF SELECTED ORGANIC ACIDS DURING THE PRODUCTION OF TRADITIONAL MORAVIAN WINE BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS (CZE)

**MILOŠ DVOŘÁK, HANA ŠURANSKÁ,
and MILENA VESPALCOVÁ**

*Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of
Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova
118, 61200 Brno, Czech Republic
mil.dvorak@seznam.cz*

Summary

This paper describes application of capillary zone electrophoresis for determination of selected short-chain organic acids in wine must during the controlled fermentation process by inoculation of fresh must by autochthonous (isolated) *S. cerevisiae* strain. In order to determine organic acids indirect photometric detection (254 nm) was used. We separated six basic organic acids with short chain and identified in real samples. Separation system contained 3,5-dinitrobenzoic acid and cationic surfactant (CTAB). Separation took place on uncoated fused silica capillary. We focused on monitoring of organics acids amount during fermentation process.

1. Introduction

Determination of major organic acids in wine must is an important control step for biotechnological productions and microbiological tests. Their composition and changes are an indicator of the state of the process, as an indicator of sensory and quality characteristics of the product. In the field of microbiology carboxylic acids are an important parameter that helps the taxonomically classify the microbes or to monitor the impact of changes in conditions on the behavior of microorganisms¹. Quick and easy alternative with sufficient efficiency offer electromigration methods. In particular, capillary zone electrophoresis and their arrangement is the most suitable principle for rapid analysis of biological samples containing short-chain organic acids².

2. Experimental

All reagents were of analytical grade (p.a). Standards of organic acids and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were from Sigma-Aldrich, 3,5-dinitrobenzoic acid (3,5-DNB) from Penta. Standard stock solutions were prepared with purified water (Milli-Q).

Capillary electrophoresis system was used PrinCE 460 (PrinCE Technologies B.V., Emmen, Neederland)

with UV-VIS detector Spectra SYSTEM UV2000 (Thermo Separation Products Inc., San Jose, USA) and fused silica capillary, I.D 50 μm (MicroSolv Technology Corporation, Long Branch, NJ, USA). Registration of signal was realized by CSW 1.7 (DataAppex, Praha, Czech Republic).

All solutions were before used filtered through a 0.45 μm membrane. Background electrolyte (BGE) contained 10 mmol L^{-1} 3,5-dinitrobenzoic acid with 0,2 mmol L^{-1} CTAB. pH was set up at 3,2 (NaOH). Fused silica capillary had total length 75 cm, effective length 25 cm. Before first analysis capillary was conditioned with 1 mol L^{-1} NaOH (1200 mBar, 20 min), Milli-Q water (1200 mBar, 10 min), and BGE (1200 mBar, 10 min) with elektrokinetic flush (+25 kV). Between analyses capillary was reconditioned BGE with elektrokinetic reflush (1200 mBar, +25 kV, 5 min). The electrophoretic system was operated with inverted polarity and constant voltage of -30 kV. Indirect photometric detection was set up 254 nm. Temperature of all systems was constant at 25 °C (ref.³).

Samples of wine must at different stages of fermentation for analysis were filtered (0.45 μm porous membrane) and diluted MQ-Water.

Samples of wine must were fermented by different strains of yeast – commercial and isolated “in situ” from vineyard. Different strains of yeast were applied to the wine must from vineyard differing of agricultural processing – ecological and integration process. Isolation of yeast and prepare of fermented must are not subject of this research⁴.

3. Results and discussion

27 samples of white wine must was measured (“Sauvignon blanc” variety) and 46 samples of red wine must (“Pinot noir” variety). “Sauvignon blanc” must was obtained from ecological agriculture process and “Pinot noir” must were obtained from ecological and integrated agriculture process. Both musts were fermented by commercial and autochthonous *S. cerevisiae* strain.

We determined tartaric, citric, malic, lactic, succinic and acetic acids during the process of fermentation. Significant differences were observed only in the case tartaric and malic acid (decrease of amount in the time) and lactic acid (increase of amount). Results of changes amount determined acids white and red must correlated. It was observed, that acetic, citric and succinic acid are not utilized.

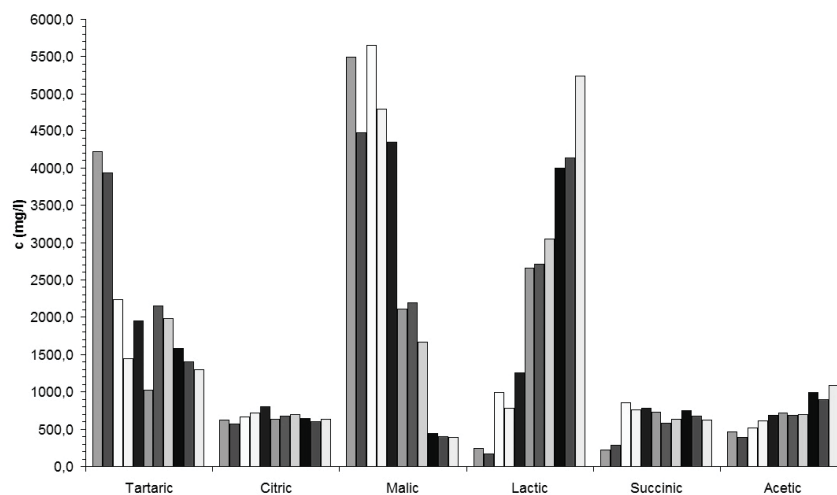


Fig. 1. Example – Determined concentration of organic acids (mg L^{-1}) in the time. Samples: "Pinot noir" variety obtained from ecological agriculture vineyard, must was inoculated by commercial yeast

4. Conclusions

Capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection and chosen separation system is shown to be sufficient and effective tool for monitoring of the content of carboxylic acids in the wine must. Method was fast enough, economical and effective. It reflected a sufficient reproducibility. We determined amount of selected organic acids in wine musts, the amount of organic acids seems to be independent of yeast strains and mode of grape agriculture.

REFERENCES

1. Sádecká, J., Polonský, J.: J. Chromatogr., A 880, 243 (2000).
2. Molnár-Perl, I.: J. Chromatogr., A 891, 1 (2000).
3. Peres R. G., Moraes E. P., Micke G. A., Tonin F. G., Tavares M. F. M., Rodriguez-Amaya D. B.: Food Control 20, 548 (2009).
4. Šuranská H., Vránová D., Omelkova J., Vadkertiová R.: Chem. Pap. 66, 861 (2012).

MONITORING OF SELECTED ORGANIC ACIDS DURING THE PRODUCTION OF TRADITIONAL MORAVIAN WINE BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

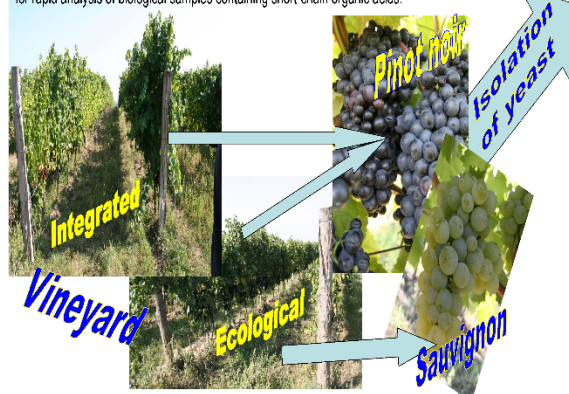
Miloš Dvořák, Hana Šuranská, Milena Vespačová

Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic
e-mail: mil.dvorak@seznam.cz

Introduction

Determination of major organic acids in wine must is an important control step for biotechnological productions and microbiological tests. Their composition and changes are an indicator of the state of the process, as an indicator of sensory and quality characteristics of the product. In the field of microbiology carboxylic acids are an important parameter that helps the taxonomically classify the microbes or to monitor the impact of changes in conditions on the behavior of microorganisms.¹

Quick and easy alternative with sufficient efficiency offer electromigration methods. In particular, capillary zone electrophoresis and their arrangement is the most suitable principle for rapid analysis of biological samples containing short-chain organic acids.²



Experimental arrangement

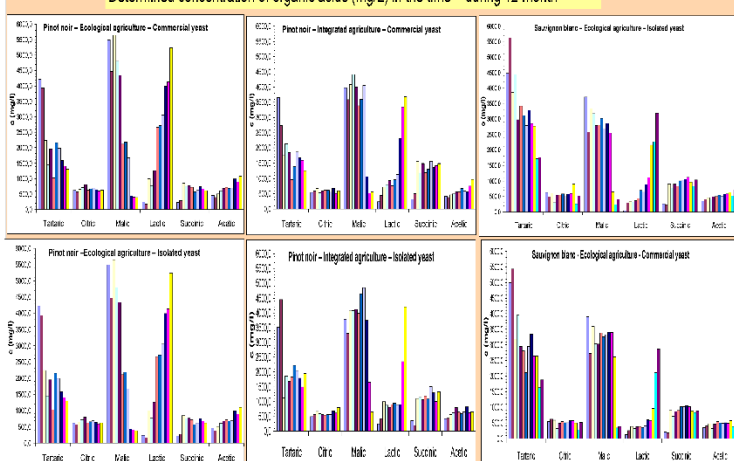
Samples of wine must were fermented by different strains of yeast – commercial and isolated "in situ" from vineyard. Different strains of yeast were applied to the wine must from vineyard differing of agricultural processing – ecological and integration process. Isolation of yeast and prepare of fermented must are not subject of this research.^[4]



Condition of method³

Background electrolyte	10 mM 3,5-dinitrobenzoic acid / 0.2 mM CTAB, set for pH 3.2/NaOH
Capillary	Non-coated fused silica capillary, effective length 25 cm, total 75 cm, I.D. 50 µm
Temperature, Injection	25°C Hydrodynamic, 5 kPa, 6 s
Separation voltage	Inverted polarity -30 kV
Detection	UV-VIS indirect detection at 254 nm
Instrument	CZE system: PinCE 460 (PinCE Technologies) UV-VIS detector Spectra SYSTEM UV2000 (Thermo Fischer Sc.)

Determined concentration of organic acids (mg/L) in the time – during 12 month



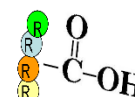
Results & discussion

- 27 samples of white wine must was measured ("Savignon blanc" variety)
- 46 samples of red wine must ("Pinot noir" variety).
- "Savignon blanc" must was obtained from ecological agriculture process
- "Pinot noir" must were obtained from ecological and integrated agr. process
- Both musts were fermented by commercial and autochthonous *S. cerevisiae* strain

We determined tartaric, citric, malic, lactic, succinic and acetic acids during the process of fermentation.

Significant differences were observed only in the case tartaric and malic acid (decrease of amount in the time) and lactic acid (increase of amount). Results of changes amount determined acids white and red must correlated. It was observed, that acetic, citric and succinic acid are not utilized

We determined amount of selected organic acids in wine musts, the amount of organic acids seems to be independent of yeast strains and mode of grape agriculture.



Literature

- [1] Sáděcká, J., Polonský, J., Journal of Chromatography A, 2000, Volume 880, Issues 1-2, 243-279.
- [2] Molinier-Petit, J., Journal of Chromatography A, 2000, Volume 891, Issue 1, 1-52
- [3] Peres, R.G., Moraes, E.P., et al., Food Control, 2009, Volume 20, Issue 6, 546-552
- [4] Šuranská, H., Vráňová, D., et al., Chemical Papers, 2012, Volume 65, Issue 9, 861-868.

11.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

Příspěvek (odborný článek) do odborného zahraničního impaktovaného časopisu *Analytica Chimica Acta* v roce 2015.

Analytica Chimica Acta 896 (2015) 166–176



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components



Yan Li ^a, Miloš Dvořák ^{a, b}, Pavel N. Nesterenko ^a, Roger Stanley ^c, Nantana Nuchtavorn ^{a, d}, Lenka Kujovská Krčmová ^{e, f}, Jana Aufartová ^e, Mirek Macka ^{a, *}

^a School of Physical Sciences and Australian Centre for Research on Separation Science (ACROSS), University of Tasmania, Private Bag 75, Hobart 7001, Australia

^b Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

^c Centre for Food Innovation, University of Tasmania, Locked Bag 1370, Launceston 7250, Australia

^d Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok, 10400, Thailand

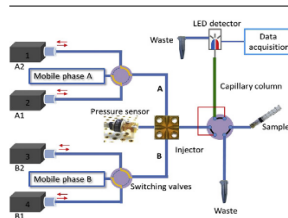
^e Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

^f Ill. Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- Portable medium pressure liquid chromatography (MPLC) system is designed.
- Modular flexible open platform design with off-the-shelf component is used.
- A microfluidic platform with 5 μL syringe pumps can operate at up to 10 MPa pressure.
- UV LED on-capillary photometric detection performed after the capillary column.
- Isocratic and gradient separations of dyes and preservatives are demonstrated.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Received in revised form

2 September 2015

Accepted 4 September 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Portable liquid chromatography

Capillary liquid chromatography

Microfluidics

Light emitting diode photometric on-

capillary detection

ABSTRACT

Trends towards portable analytical instrumentation of the last decades have not been equally reflected in developments of portable liquid chromatography (LC) instrumentation for rapid on-site measurements. A miniaturised medium pressure capillary LC (MPLC) system with gradient elution capability has been designed based on a flexible modular microfluidic system using primarily off-the-shelf low cost components to ensure wide accessibility to other analysts. The microfluidic platform was assembled on a breadboard and contained microsyringe pumps and switch valves, complemented with an injection valve and on-capillary detectors, all controlled by a PC. Four miniaturised microsyringe pumps, with 5, 20 and 100 μL syringe volume options, formed the basis of the pumping system. Two pairs of pumps were used for each mobile phase to create gradient elution capability. The two microsyringe pumps in each pair were linked by two electrically operated microfluidic switching valves and both pairs of pumps were connected through a zero void volume cross-connector, thus providing a low hold-up volume for gradient formation. Sample was injected by a 20 nL nano-LC sampling valve, directly connected to a 18 cm long 100 μm i.d. Chromolith CapRod RP-18 monolithic capillary column. On-capillary LED-based

* Corresponding author.

E-mail address: Mirek.Macka@utas.edu.au (M. Macka).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.015>

0003-2670/Crown Copyright © 2015 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Open platform design
Off-the-shelf components

UV–vis photometric detection was conducted through a piece of equal diameter fused silica capillary connected after the column. The performance of the portable LC system was evaluated theoretically and experimentally, including the maximum operating pressure, gradient mixing performance, and the performance of the detectors. The 5 μ L microsyringe pump offered the best performance, with typical maximum operating pressures up to 11.4 ± 0.4 MPa (water) and gradient pumping repeatability of between 4 and 9% for gradients between $0.10\% \text{ s}^{-1}$ and $0.33\% \text{ s}^{-1}$. Test analytes of charged and uncharged dyes and pharmaceuticals of varying hydrophobicity showed typical RSD values of 0.7–1.4% and 3.3–4.8% in isocratic mode and 1.2–4.6% and 3.2–6.4% in gradient mode, respectively for retention time and peak area repeatability.

Crown Copyright © 2015 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Miniaturisation of scientific instrumentation is of a great importance in engineering [1], medical science [2] and chemistry [3]. From the 1990s, the concept of lab-on-a chip and micro-total analysis systems (μ TAS) led a revolution of miniaturization in analytical chemistry [4]. The progress in these areas has created the potential for scientific instrumentation to be more portable and robust as well as affordable. Many portable analytical devices are commonplace as commercialised products, including mobile pH meters, electrochemical detections and spectrometers. Miniaturization of separation and flow-analysis portable devices such as capillary electrophoresis (CE) [5,6] and gas chromatography (GC) [7–14] has also been widely explored.

However, although liquid chromatography and the high-pressure mode HPLC have been commonly used in many areas of chemistry and biological science for the last half century [15,16] there has been a lack of development related to mobile field analysis applications. The bench-top dimensions and significant weight of each functional part in a LC system have hampered progress in the development of portable LC. The theory and practice of capillary and miniaturized LC systems being widely published, as academic research with in-house based designs, such as by Sestak et al., 2013 [17]. Such designs have only been rarely commercialized, thus significantly limiting the availability of such portable systems for other users.

An early attempt to develop and commercialise a portable LC by Baram et al. [18] in 1983 was continued through the 1990s, and in 1996 another portable LC device was released [19]. This new portable LC system weighed 14 kg and was driven by two microsyringe pumps, which enabled a gradient elution mode to be used. The devices were designed for mobile laboratory use where regular line power was available. Several more works on LC systems that were intended to be commercialised were reported from other groups [20,21]. A number of in-house laboratory-designed and built portable LC systems have been reported including ion-exchange chromatography [22–25] and immunoextraction-reversed-phase liquid chromatography [26]. Recently, Sharma et al. [27] reported a battery-operated nano-flow portable LC system, featuring pumps from a leading fluidic company (VALCO, Houston, TX, USA). The system offered a satisfactory isocratic separation performance and excellent detection performance of a UV-LED photometric detector [28]. While many of the previous portable LC designs including the early days developments presented numerous interesting specific design elements and are advanced for its time, with a few exceptions such as in the recent work [27], most of these presented LC system were primarily in-house fabricated, and none of them seems to have been widely available to the user. Therefore, in this work we explored a different strategy leading to wide accessibility, and that is through an open platform modular flexible design drawing on widely accessible off-

the-shelf components. This design philosophy is aimed at maximum flexibility in implementing custom design elements such as in-line sample preparation or post-column derivatisation, while keeping portability and relatively low cost.

Regarding the terminology for the different types of LC depending on the pressure used, it should be noted that it can be categorised as follows: Gravity LC uses very low pressures, then low-pressure chromatography (LPLC) using peristaltic pumps at pressures generally below 0.5 MPa, followed by medium pressure LC (MPLC) carried out at pressures up to ca. 10 MPa, then high performance LC (HPLC) that has been defined as using pressures up to ca 40 MPa, and finally the recently emerged ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) that shifted the upper limits of pumps above 120 MPa (1200 bar). Therefore the term medium pressure LC or MPLC is used here. Similarly, when defining the scale of fluidic designs and components, according to Whitesides [29], the term “microfluidic” would be generally accepted with dimensions of tens to hundreds of micrometres (thus representing microfluidic planar or capillary channel devices sometimes called chips). Therefore the term microfluidic is justified based on those criteria independent on the device format (e.g. microfluidic chip, or capillary).

The investigation was undertaken to design and characterise a portable capillary MPLC system with mobile phase gradient capability assembled primarily from off-the-shelf components on a microfluidic platform as a backbone of the system. The system characterisation took account of the operating pressure, the performance of microsyringe pumps and the efficiency of separation in isocratic and gradient modes. The initial test analytes included primarily charged and uncharged dyes of varying hydrophobicity.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Analytical or higher grade reagents and deionised water (Millipore, Bedford, MA, USA) were used for preparing all solutions. Potassium dichromate, Sudan III (SIII) and Sudan IV (SIV) were purchased from Ajax Chemicals (Auburn, NSW, AU). Indigo carmine (IC) was purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA), sodium dihydrogen phosphate, coumarin 102 (CM), methyl 4-hydroxybenzoate (MHB), ethyl 4-hydroxybenzoate (EHB), propyl 4-hydroxybenzoate (PHB), butyl 4-hydroxybenzoate (BHB), methanol and acetonitrile were sourced from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Brilliant yellow (BY) was purchased from BDH Chemicals (Poole, United Kingdom). Tetrabutylammonium hydroxide was purchased from Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Naphthol yellow (NY) and orange G (OG) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland), tartrazine (Tar) was purchased from Fluka (Neu-Ulm, Germany). Ammonium acetate was purchased from May and Baker (West Footscray, Victoria, AU) and Martius yellow (MY) was sourced from

May and Baker (London, United Kingdom). Sunset yellow (SY) was purchased from Melbourne Food Depot (West Footscray, Victoria, AU). Brilliant blue (BB) was purchased from Queen Fine Foods ("Blue", BB concentration 1.8% as aqueous solution, St. Alderley, QLD, AU). Phosphoric acid was obtained from Univar (Auburn, NSW, AU).

The stock solutions of potassium dichromate, orange G, naphthol yellow and brilliant yellow were prepared by dissolving in water. The stock solutions of martius yellow, coumarin, Sudan III and Sudan IV were prepared by dissolving in methanol. The stock solution of methyl 4-hydroxybenzoate (MHB), ethyl 4-hydroxybenzoate (EHB), propyl 4-hydroxybenzoate (PHB), butyl 4-hydroxybenzoate (BHB) were prepared in 50 mM ammonium acetate – acetonitrile 70/30 (v/v).

2.2. Instrumentation

The portable MPLC system was constructed using a LabSmith's uProcess™ microfluidic system ("Microfluidic Fluid Control & Connectors" [30]) as the backbone, with LabSmith and other off-the-shelf components assembled on a breadboard. The experimental system design is schematically and photographically presented in Fig. 1.

The nanofluidic pumping system consisted of four SPS01 programmable microsyringe pumps ($100 \times 25 \times 21$ mm) with SPS01 glass syringes of three different volume options (5, 20, and 100 μL), 2 AV201-C360 four port, two position microfluidic switching valves and a uPS pressure sensor (all components from LabSmith, Livermore CA, USA). The dispensing volumetric flow rate of these pumps is $0.0036\text{--}141 \mu\text{L min}^{-1}$, $0.0145\text{--}560 \mu\text{L min}^{-1}$ and $0.073\text{--}2800 \mu\text{L min}^{-1}$ when assembled with 5, 20, and 100 μL volume syringe, respectively, varied by the uProcess™ software, which also allows the operation of other LabSmith switching microvalves and pressure sensors. For a summary overview, all the specifications for the LabSmith's components are detailed in the Electronic Supplementary Information (ESI) in Tab. S1, Tab. S2.1, Tab. S2.2, Fig. S1, Fig. S2.1 and Fig. S2.2.

The injection system was a 20 nL VICI valco nano-injector (Houston, TX, USA). A $180 \text{ mm} \times 100 \mu\text{m}$ i.d. and a $180 \text{ mm} \times 100 \mu\text{m}$ i.d. Chromolith CapRod RP-18 monolith column was used for testing the separation performance (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The connection between the cross connector and the nano-injector was 80 mm polyimide (PI) coated fused silica capillary (PI-coated capillary, 150 μm i.d., 360 μm o.d.; Polymicro Tech; Phoenix, AZ) and the other components were connected by a PEEK capillary (150 μm i.d.; LabSmith). Connections between each component and the capillaries were performed using four PEEK fittings (360 μm o.d.; LabSmith). The restrictor for testing the maximum pressure of the system was PI-coated capillary (1.5 m, 50 μm i.d., 360 μm o.d.; Polymicro Tech), and the restrictor used for testing the pumping system eluent performance was PI-coated capillary (200 mm, 25 μm i.d., 360 μm o.d.; Polymicro Tech).

The LED-based photometric detector was assembled as an on-column or on capillary (PI-coated fused silica; 100 μm i.d.; Polymicro Tech, with a detection windows created by burning a small portion of the PI coating off the capillary using a butane torch). The design used an Agilent optical interface (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, Alignment interface, extended 50 μm coded Red) housed in an in-house designed black nylon holder introduced and described in detail earlier [31,32]. The LED light source was fixed into a 10 mm i.d. sleeve on each side of the in-house made holder, being aligned with the detection window of the capillary. A controlling unit [32] was employed to control and record the LED current and detector signal (absorbance after digital log conversion by the controlling unit). This unit can also adjust the absorbance

offset value, and the resultant output absorbance was fed into an eDAQ (Denistone East, New South Wales, Australia) integrated potentiostat system E466 converter (potentiostat function not used in this work, only data acquisition), which interfaced the LED detector and the eChart software as the data acquisition unit. The LEDs used were purchased from Oatley (NSW, Australia, emission wavelength 355 nm, 470 nm and 600 nm) and Crystal IS (Green Island, NY, USA, OPTAN255H, emission wavelength 255 nm). Two hybrid photo detectors, both containing photodiode and amplifier, were used in the detection system. A UV/blue-enhanced silicon photodetector (SiPD) purchased from Integrated Photomatrix Ltd. (Dorchester, UK, IPL10530DAL) was used for detection at 355 nm, 470 nm and 600 nm in conjunction with the corresponding LED. A broadband SiC based UV photodetector purchased from Sglux SolGel Technologies GmbH (Berlin, Germany, TOCON_ABC2) was used for detecting at the wavelength of 255 nm. The LED was powered by a constant current power supply [32], which was set at a current of 10 mA, 30 mA, 25 mA and 8.5 mA for 255 nm, 355 nm, 470 nm and 600 nm LEDs, respectively.

Software from uProcess™ (LabSmith) was used for driving the LabSmith components. In this work, all the data were recorded at 20 Hz. The presented chromatograms were online processed by mains digital filter (50 Hz) and a low-pass digital filter with a cut-off frequency of 1 Hz showing a negligible effect on peak heights. The digital filters can be used online during the data acquisition as well as in post-processing mode with numerically identical results.

2.3. Methods

An AM7013MZT4 Dino-Lite Premier USB microscope (Dino-lite, Hsinchu, Taiwan) was employed for the measurement of the cross-section of the microsyringe pump pistons to accurately calibrate the volumes. The position of the piston in the transparent glass syringe was firstly captured and recorded by the microscope. The piston was then moved to create or reduce a known volume of space in the syringe (1 μL , 4 μL and 20 μL for 5 μL , 20 μL and 100 μL syringes, respectively), and the position was captured and recorded again. The cross-section of the piston was then calculated by the length of the piston's movement and the known displacement volume.

According to the motor manufacturer's (Haydon Linear Motors Co., Ltd, Changzhou, China) specification, the maximum force created by the motor is 7 N. The cross-section areas of the piston were obtained from both the manufacturer and our experimental measurement using the microscope as schematically illustrated in ESI. Experimentally, the pressure in the system was firstly measured by a LabSmith pressure sensor (maximum measuring pressure 0.8 MPa) at different flow rates, with water and with methanol. The pumped liquid was collected as effluent and weighed to experimentally determine the flow rate. The pumped liquid was collected into 2 mL plastic sample vials using a PEEK capillary (150 μm i.d., 360 μm o.d.) tube passed through the sample vial lid via a 400 μm hole to minimise the liquid evaporation during the collecting and weighing. The pressure sensor was then disconnected from the system, and the flow rate was increased step-wise with the flow measured for each new pumping rate set, until the experimentally measured flow rate began to fall below the set amount (in the case of the 5 μL glass syringe), or the piston could not move any more (in the case of the 20 μL glass syringe). Finally, the maximum usable pressure was extrapolated from the maximum operating flow rate. This measurement was done using each of the three 5 μL glass syringes and the 20 μL glass syringe.

The overall performance of the pumping system was tested by visualising the step gradient process using a strongly absorbing B mobile phase. One pump (A) dispensed water and another (B)

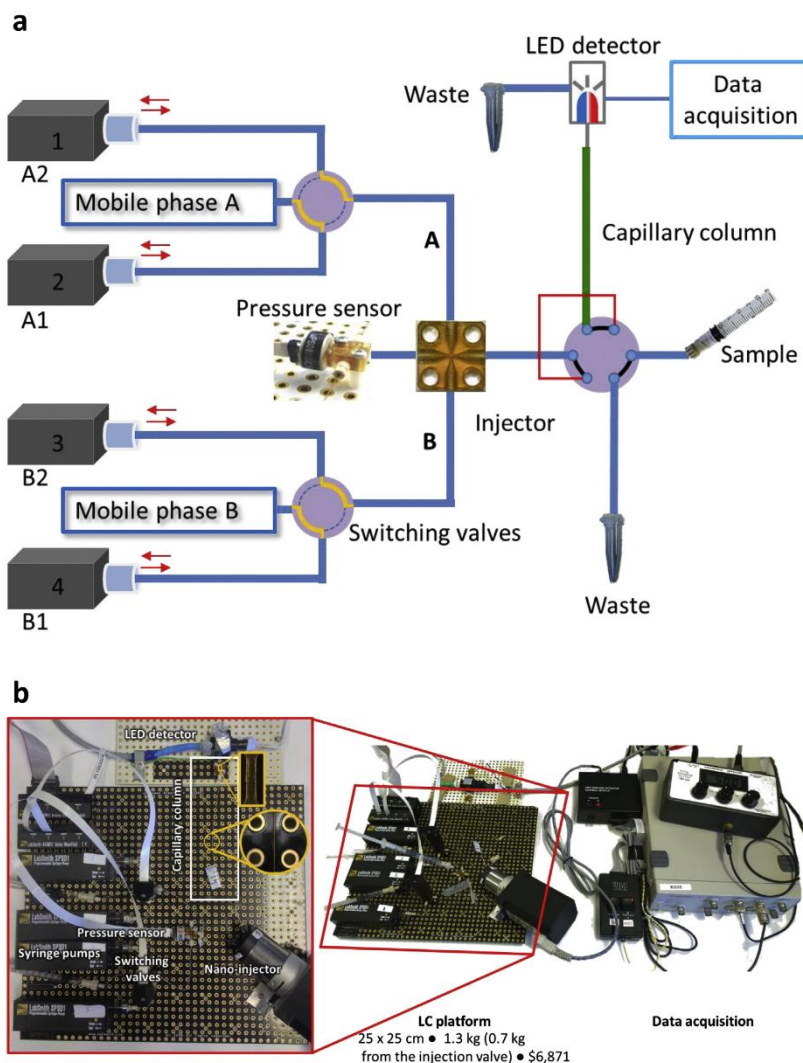


Fig. 1. The schematic and photograph of the portable MPLC system.

pumped the absorbing solution, which was tartrazine (5 mM). To minimise external mixing effects, on-capillary detection was conducted through the capillary (3 mm, 25 μm i.d.) as close as possible to after the mixing point in the cross-interconnector, excluding the sample injector in this gradient testing system. Firstly, only water was pumped, then the concentration of tartrazine was increased stepwise from 10% to 100% (v/v). The resulting mixed flow was detected by photometric detector at 470 nm. The test was done with the 5 μL and 20 μL syringes, at flow rates of 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ and 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. For testing of the effect of pressure resistance against which the pump has to perform on the pumping performance, a

piece of narrow bore PI-coated capillary (200 mm, 25 μm i.d.) was added after the mixing point and before the detector as the restrictor, which generated ca. 3.5 MPa pressure into the system. The gradient of elution composition profile was tested for the 5 μL syringe by visualising the linear gradient process using a strongly absorbing B mobile phase. One pump (A) dispensed water and another (B) pumped the absorbing solution, which was potassium dichromate (10 mM) that absorbs strongly at 472 nm increasing the ratio of %B, from 0 to 100%. The gradient was delivered at a flow rate of 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, with B increasing at a rate of 0.1% s^{-1} , 0.2% s^{-1} and 0.33% s^{-1} . The resulting flow with varied %B in time was then

detected using the 470 nm LED photometric detector.

3. Results and discussions

3.1. Design considerations

Most previous research on portable LC systems is based on in-house designs which are difficult for other researchers to reproduce. This research aimed at an 'open platform' system that could be relatively easily replicated from off-the-shelf components. The main criteria used for designing the portable LC are outlined in Scheme 1. The choices of specific components from specific manufacturers are, to a large degree, governed by convenience and availability and can be varied. The system is integrated using a notebook microcomputer. From previous work we noted a flexible modular microfluidics platform [30] was widely used in microfluidics, but intended only for low-pressure use (up to 3.4 MPa, see Tab. S2.1). However, microsyringe pumps should be able to operate at considerably higher pressures. The limiting factors will be (1) the maximum force delivered by the microgear mechanics onto the microsyringe piston, and (2) possible leaks at the PTFE piston seal, with both reflected in the tests as shown in Fig. 2 and discussed in the following section. In order to assess the theoretical maximum operation pressure values for the micropumps, the force applied by the stepper motor gear to the piston has to be known. Therefore the pump body was dismantled to obtain the specification of the step motor and mechanical gear inside each pump encasement. The maximum force of the micro-stepper motor and gear, as given by the manufacturer, was 7.0 N. The syringe pumps we used therefore have the potential to deliver a theoretical maximum pressure of up to 17 MPa, based on the specified forward force of the gear medium pressures for the smaller 5 μL syringes and the cross-sectional area (see details in the ESI Fig. S3.2 and Tab S3). Initial trials confirmed the actual pressure the 5 μL syringes were capable of was in the range of ca. 68% of the theoretical pressure but still a significantly high pressure in an LC context.

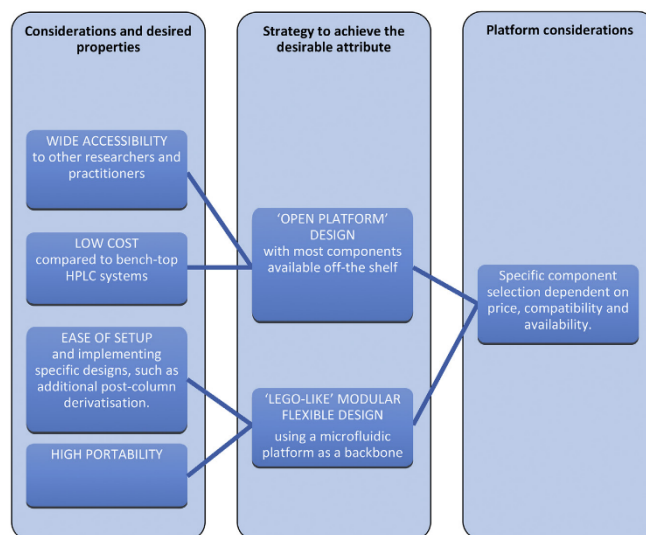
Our design had two pumps being connected through an automated electrically actuated microfluidic 4-port switching valve (swept volume 90 nL), thereby creating simultaneous operation of two pumps: one pump dispensing the mobile phase while another pump refills the mobile phase, which thus allows the dispensing system to deliver eluent continuously without interruption in the same manner similar to a classical dual-piston HPLC pump [33]. Two pairs of microsyringe pumps serve each mobile phases "A" and "B". In total, four miniaturised microsyringe pumps with fixed volume capacities of 5, 20 or 100 μL were linked in pairs through a cross-interconnector with void volume of 38 nL, thus providing an extremely low hold-up volume for gradient formation.

Several individual pumps as needed (LabSmith board can accept 1–6 pumps) can be assembled in a 'LEGO-like' flexible manner on a dedicated breadboard (25 \times 25 cm; LabSmith) with dedicated mechanical positioning holes and electrical connections. The switching valve has a swept volume of 90 nL, the maximum operation pressure is up to 34 MPa and the switching time according to the manufacturer is less than 0.5 s [30]. The stem in the switching valves is a dual cut stem, which routes the fluid simultaneously between two sets of adjacent port (Fig. 1). In total, four microsyringe pumps were linked in pairs, as described, connected together through a cross-interconnector (1 cm, 1 cm, 0.4 cm; LabSmith) with a void volume of 38 nL. The dispensing volumetric flow rate of these pumps is from 0.04 $\mu\text{L min}^{-1}$ to 5600 $\mu\text{L min}^{-1}$, varied by the uProcess™ software. In this work, we used 5 μL glass syringes for most of the work and specifically to test the separation performance. The schematics and photograph of the portable LC is shown in Fig. 1 and technical information details are given in the Experimental section. In the following sections the performance of this system is detailed.

3.2. Pumping and fluidic system performance

3.2.1. Maximum pressure

The maximum created pressure is a key factor that determines



Scheme 1. Considerations and desired properties of portable LC and corresponding strategies to achieve them by choices of desirable attribute.

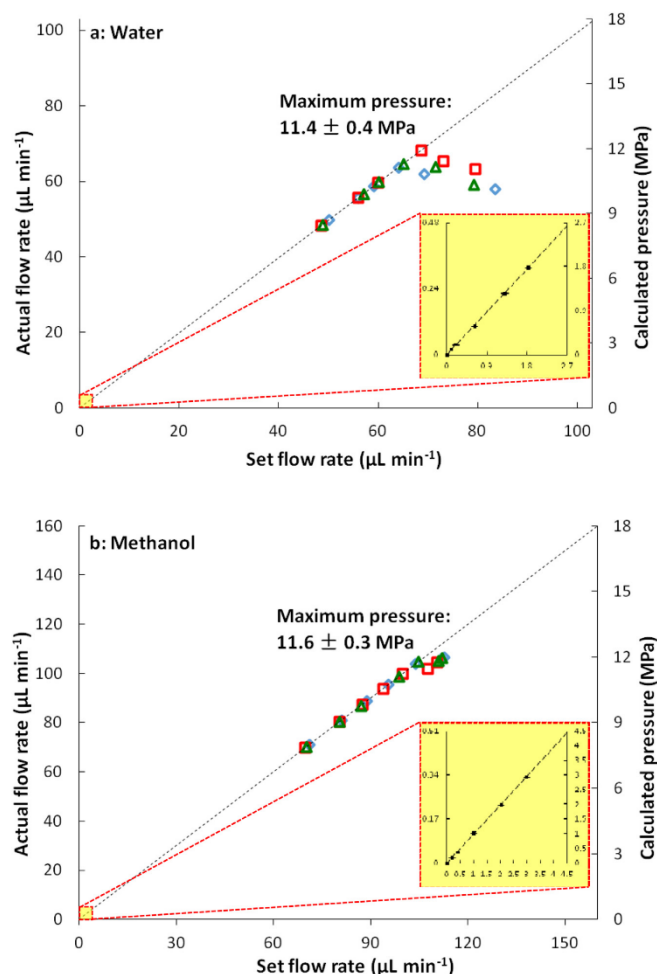


Fig. 2. Graph of pressure versus flow rate for 5 μ L microsyringe pumps. Pressure above 0.4 MPa (main graph) were determined by extrapolating the calibration plot (insert) of measured pressure by pressure sensor versus experimentally determined flow rates. For other conditions see Experimental. Legend: The individual markers \square , \triangle and \diamond represent three different gears with three individual syringes.

how effectively the system can operate with an acceptable performance [15]. The maximum pressure created by the syringe was determined experimentally in comparison to the theoretical maximum of up to 17 MPa (see Fig. S3.2 and Tab. S3).

The actual flow rate was measured experimentally and the maximum pressure was calculated by extrapolating from the maximum operating flow rate, as described in the Experimental section, and shown in Fig. 2 and Fig. S4. In brief, the maximum created pressure for 5 μ L and 20 μ L syringes were measured for both water and methanol by first establishing the pressure vs. flow rate calibration, that in the absence of significant frictional heat, will be linear [15,34]. Therefore pressures higher than 0.8 MPa, which was the maximum measurement range of the microfluidic pressure sensor, could be determined based on experimentally

determined flow rates. The slope of the plot for methanol is about 63% of that for water in accordance with the lower viscosity of methanol being about 61% of water (at 20 °C). The maximum created pressures for the 20 μ L and 5 μ L syringes were 6.5 ± 0.3 and 11.5 ± 0.3 MPa, respectively ($n = 6$). For the 20 μ L syringes, the experimental results were 49% higher than the theoretical values, probably due to the real maximum force of the motor being higher than the specified value (7 N). The experimental points with pressure values larger than the maximal pressure are seen as being positioned significantly below the linear relationship pressure vs. flow rate, indicating a breakdown of the pumping capability. Although leaks at relatively low flow rates, in the order of $1 \mu\text{L min}^{-1}$ or below typical for capillary LC, are not easy to locate it can be reasoned that above a certain pressure the mobile phase

liquid would leak along the side of the piston before the motor achieved its maximum force. The measured maximum pressure can therefore be lower than the theoretical number.

3.2.2. Pumping system eluent composition performance

For an LC system, the repeatability of retention times depends on a constancy of flow rate [35]. In addition, for a gradient LC system, the performance will also depend on how accurate and reproducible the changes in %A and %B composition are during the formation of the gradient by the pumps. A graph of gradient shapes experimentally obtained are often part of technical parameters given by the manufacturer for HPLC systems [36]. It should be noted that the lowest flow rate increment of $0.0036 \mu\text{L min}^{-1}$ ($5 \mu\text{L}$ microsyringe) corresponds at a flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$ to a mobile phase composition increment of 0.36% B. While a better flow rate resolution would be expected for high performance LC systems, this can be regarded as satisfactory for a low-cost miniaturised MPLC system.

The performance of the pumping system was characterised by the step gradient process, as described in detail in the Experimental section and shown in Fig. 3 and Fig. S5. A strongly absorbing substance (tartrazine) was added to mobile phase B so that a proportional increase in detection signal was obtained with increased %B. As apparent from Fig. 3, fluctuations of flow rate were generally visible at all pumping conditions. It is very important that results measured at very low pressure resistor (no column, $p < 0.01 \text{ MPa}$) exhibit much larger pulsations compared to those with pressure resistance such as a column or even just a piece of pressure

resistance capillary of ca 0.35 MPa (as shown in figures Fig. 3 and Fig. S5), showing a dramatic improvement (over an order of magnitude decrease in baseline fluctuations). It should be noted that the mixing introduced by the pressure resistor capillary is relatively small as evidenced by the small difference in the slopes of the steep upwards segments between individual %B steps (see highlighted in Fig. 3), therefore the major part of the improvement is not result of introduced mixing, but of improved performance of the microsyringe once pumping against pressure. This phenomenon is well known from classical check-valve based HPLC pumps, although the specific reasons would be different here, likely in the mechanics of the microgear performing better against some resistance. The pumping system performed better when working at the flow rate of $5 \mu\text{L min}^{-1}$ compared to the flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$. Also, the performance of pumping system was better when $5 \mu\text{L}$ syringes were used compared with $20 \mu\text{L}$ syringes. The mechanical stepper motor driven microsyringe pumps expel liquid incrementally and therefore liquid pumping precision will be better for a smaller syringe and the accuracy of flow rate depends on the volume of step size (see Tab. S3.). When the flow rates were close to the volume of step size, the fluctuations were relatively high. The $5 \mu\text{L}$ syringes have smaller step size (8 nL), than the $20 \mu\text{L}$ syringes (33 nL), and therefore the 5 nL microsyringe pump provide smoother pumping and better performance.

Further, any interferences that may be caused by the valve switching were tested. Results for test runs with switching events indicated by red arrows (in web version) are shown in Fig. 3 and Fig. S5. At relatively lower flow rates such as at $1 \mu\text{L min}^{-1}$,

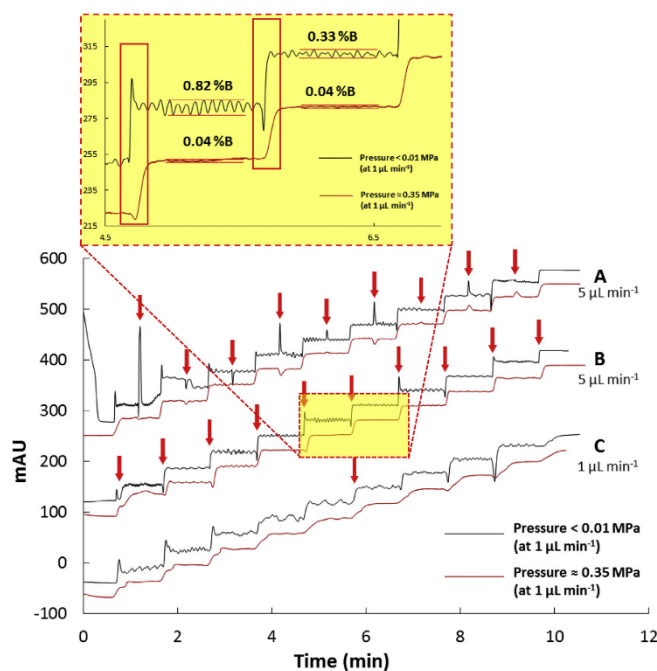


Fig. 3. Performance of microsyringe pumps using $5 \mu\text{L}$ syringes at different flow rates judged by visualised step gradient in steps of 10% from 0 to 100%B using an absorbing phase B; the arrows show the time when valves were switching. Conditions: Pump A1&A2: water, pump B1&B2: tartrazine 5 mM ; LED detection: blue LED at 470 nm . For other conditions see Experimental.

switching of the microvalve was only necessary every 5 min. Therefore the test of perturbations arising from the switching events was carried out at a flow rate of $5 \mu\text{L min}^{-1}$, when for the $5 \mu\text{L}$ glass microsyringe pumps the valves actuated once every one minute. The switching events were set at: (1) in the middle of a gradient step and (2) at the edge (start/end) of those steps when the pumping system increased the ratio of B to A by 10%. From the results, it is obvious that valve switching did not cause an interference (spike) in every switching event, but especially not at the moment where the composition of the testing solution was changing. Switching did cause some interferences, however, but due to the usage of a strong absorbing solution (tartrazine), these interferences have been exaggerated. For the capillary LC system used here with a column of $100 \mu\text{m}$ i.d., at typical flow rate around $1 \mu\text{L min}^{-1}$, the valve switching will be relatively infrequent. The system can also be programmed in such a way that the switching event is avoided for the entire run. Overall, the $5 \mu\text{L}$ syringe was found to be the best performing option for a capillary LC system.

3.2.3. Gradient of eluent composition performance

The system's performance in terms of repeatability of formation of linear gradient profiles was tested for varying the gradient as %B per second. It was visualised by again by using a strongly absorbing solution (potassium dichromate) as the "B" mobile phase with the detector after a column as shown in Fig. 4. Gradients of different steepness were created by increasing the ratio of dichromate in the detected effluent from 0 to 100% in 5, 10 and 20 min, corresponding to eluent composition as % change of 0.33 s^{-1} , 0.20 s^{-1} and 0.10 s^{-1} . The baseline repeatability for each gradient was calculated as relative (%) difference in the baseline signal between the highest and the lowest of the three, expressed as a % of their average over the entire run. These relative difference values were 3.7%, 5.5% and 9.1% for the three gradients of 0.10 s^{-1} , 0.20 s^{-1} and 0.33 s^{-1} , respectively. For each gradient, the fluctuation at the beginning and the end of the gradient was stronger than the middle due to one of the pumps operating at a low flow rate where the maximum fluctuations occurred. For the longer gradients with the steepness of 0.1 s^{-1} or 0.2 s^{-1} , switching the valves in the pumping system was necessary. The switching events are shown in Fig. 4. As expected, the valve switching did not interrupt the system performance. Under typical conditions, the necessity of valve

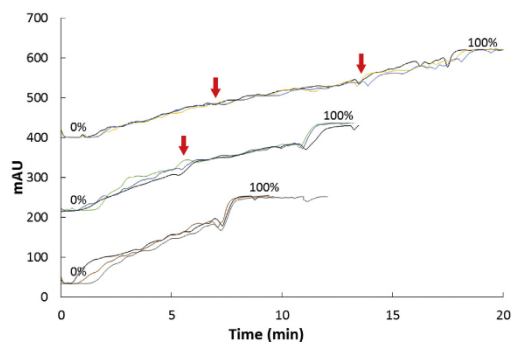


Fig. 4. Performance of the pumps using $5 \mu\text{L}$ syringe at flow rates $1 \mu\text{L min}^{-1}$ judged by the formation of linear gradient (0–100% 5 mM dichromate) detected after the column, the arrows show the time when valves were switching. Conditions: Pump A1&A2: water, pump B1&B2: dichromate 5 mM; column: $18 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m}$ i.d.; photometric detection: blue LED at 470 nm. The three differently colour coded traces are three repeats. For other conditions see Experimental. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

switching event within one run is relatively rare.

3.3. Separation performance

In capillary LC it is particularly important to minimise void volume (V_0) in the system. The void volume is composed of the volumes of capillaries and connectors between column and injector, column and detector and low cell volume in the detector. Therefore the capillary column was directly connected into the nano-injector and the column end was connected to same i.d. ($100 \mu\text{m}$) PI-coated capillary for on-capillary detection using a semitransparent union of 0.4 mm i.d. thus allowing a visual inspection that the column end and detection capillary were touching face-to-face for a zero void volume connection (Fig. 1 b). For the $100 \mu\text{m}$ i.d. monolithic RP-18 capillary column, the flow rate was $1 \mu\text{L min}^{-1}$. The wavelength of the on-capillary photometric detector was governed by the wavelength of the LED used and selected to best match the absorption spectra of the analytes, as demonstrated for three isocratic separations of different dyes in Fig. 5a. For model mixtures of eight dyes a blue (470 nm) LED was selected as an optimal wavelength to detect all the dyes.

The separation performance was tested under isocratic mode with food dyes (Fig. 5a) to investigate the sensitivity of the detection system (Fig. 5a). For this separation, the sample solvent (water) from the injection was used to detect the column void volume using the refractive index effect of the sample water. The separation of dyes was performed according to a slightly modified ion-pair chromatographic method, reported by Kiseleva et al. [37]. Three different LEDs (355 nm, 470 nm and 600 nm) were used to detect the different coloured dyes. The results show that at the optimum detection wavelength, the system is able to provide an acceptably high sensitivity. For indigo carmine, sunset yellow, tartrazine and brilliant blue the limits of detection were 1.9 nM, 0.5 nM, 1.5 nM and 1.4 nM respectively defined as using the signal equal to three times the average peak-to-peak baseline noise. The separation of parabens was undertaken using an MS-compatible mobile phase (50 mM ammonium acetate buffer with 20% acetonitrile) with detected by a deep UV-LED at 255 nm. Four parabens could be separated in less than 5 min, with a satisfactory resolution. Calibration plot shows satisfactory performance in a broad concentration range ($R^2 = 0.999, 0.999, 0.998$ and 0.997 for MHB, EHB, PHB and BHB, respectively – for details including calibration graph and parameters see Fig.S6 and Tab. S6). The repeatability of the retention times and peak areas are presented in Table 1, as well as separation efficiency. Relative standard deviations (RSD) of retention times and peak areas of 6 successive runs were 0.1–0.2% and 0.6–1.0%, respectively, which is satisfactory for applications of a miniaturised low-cost MPLC system.

The ability to use gradient elution allows separation of solutes of wide range of polarity, improves the solute detectability and with increases the speed of analysis. However, employing micro and nano columns with HPLC gradient instrumentation requires minimising the gradient hold-up volume between the point where the gradient is formed and the column [17]. For the present system, the delay in the observed gradient onset was approx. 1200 nL (Fig. 6). For the two gradient separations using MS-compatible mobile phases (50 mM ammonium acetate buffer as mobile phase A) with either methanol (Fig. 6 a) or acetonitrile (Fig. 6 b) organic solvent as the mobile phase B, and a model mixture containing up to 7 dyes in the injected sample a satisfactory resolution was obtained in 8 min. The results also show that the gradient separation results in narrower shaped peaks and thus higher peak capacity compared to isocratic separations. The repeatability of the retention times and peak areas are presented in Table 2. The relative standard deviations (RSD) of retention times and peak areas for 8 successive

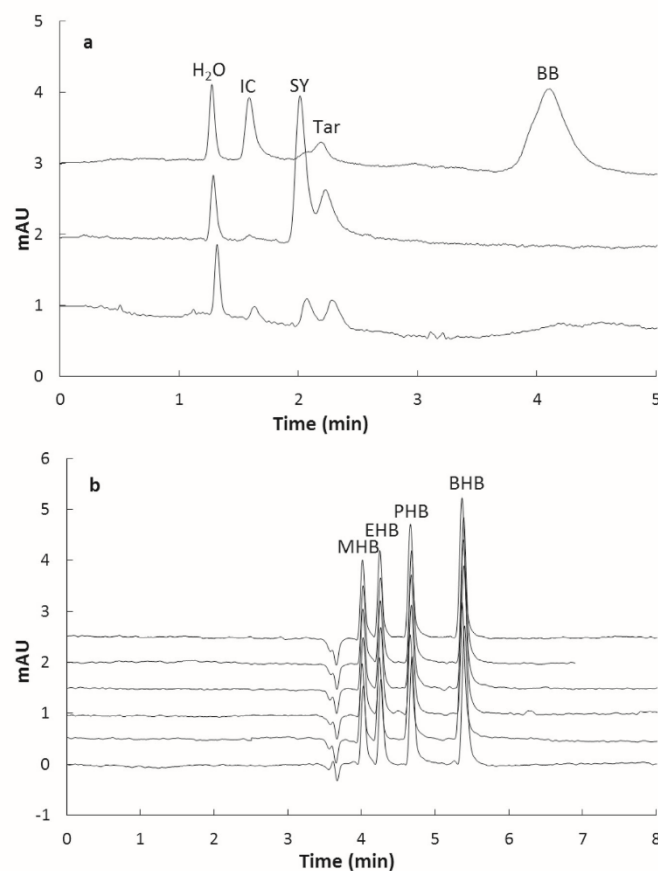


Fig. 5. Isocratic separation of model mixtures of dyes indigo carmine (IC), sunset yellow (SY), tartrazine (Tar), and brilliant blue (BB) (a), and of parabens (b). Conditions: (a) Concentration of each analyte was 0.1 mM; eluent: 10 mM phosphate buffer pH 3.3 - acetonitrile 25/75 (v/v), 10 mM tetrabutylammonium dihydrophosphate; flow rate: 1 $\mu\text{L min}^{-1}$; column: 18 cm \times 100 μm i.d., injection volume: 20 nL; detection: 600 nm, 470 nm and 355 nm LED on-capillary photometric detector. (b) Concentration of each analyte was 60 μM methyl 4-hydroxybenzoate (MHP), 60 μM ethyl 4-hydroxybenzoate (EHB), 60 μM propyl 4-hydroxybenzoate (PHB), and 60 μM butyl 4-hydroxybenzoate (BHB); eluent: 50 mM ammonium acetate - acetonitrile 50/50 (v/v); flow rate: 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$; column: 30 cm \times 100 μm i.d.; injection volume: 4 nL; detection: 255 nm LED on-capillary photometric detector.

Table 1

The repeatability of isocratic separations. Chromatographic conditions as in Fig. 6 b, for other conditions see Experimental.

Compounds	t_R (min)	RSD ($n = 6$) t_R	Peak area (mAU*s)	RSD ($n = 6$) Peak area	Efficiency (N/m)
Methyl 4-hydroxybenzoate	4.02	0.1%	6.9	0.6%	65680
Ethyl 4-hydroxybenzoate	4.26	0.1%	7.5	0.9%	73662
Propyl 4-hydroxybenzoate	4.68	0.1%	10.7	1.0%	73544
Butyl 4-hydroxybenzoate	5.38	0.2%	15.4	0.8%	80412

runs were 1.2–4.6% and 3.2–6.4%, respectively, which is a good level of performance for a miniaturised low cost MPLC system.

4. Conclusions

The array of four microsyringe pumps is used for the first time to mimic the design of classical piston type gradient pump system. The overall performance of the portable LC was found to be

comparable or superior to most other reported portable LC systems. The advantages and principal achievements comprise of:

1. Platform: A miniaturised open platform of flexible modular design, using primarily low cost off-the-shelf components that are affordable and accessible to other researchers.
2. Fluid delivery system: (i) The pumping system operates in a continuous mode, (ii) the flow is defined/set (unlike with

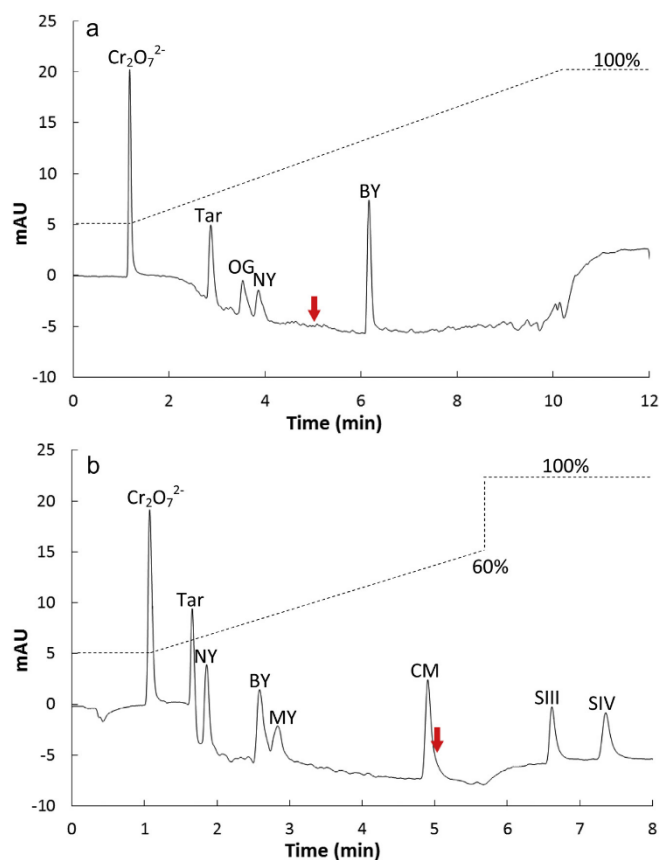


Fig. 6. Gradient separation of model mixtures of dyes and void volume marker (dichromate) using methanol (a) and acetonitrile (b). Conditions: (a) Concentration of each analyte: dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) 5 mM, tartrazine (Tar) 1 mM, orange G (OG) 1 mM, naphthol yellow (NY) 1 mM and brilliant yellow (BY) 1 mM; eluent A: 50 mM ammonium acetate (pH 5), eluent B: methanol, linear gradient 0–100% B in 8.3 min; flow rate $1 \mu\text{L min}^{-1}$. (b) Concentration of each analyte: dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) 4 mM, tartrazine (Tar) 1.5 mM, naphthol yellow (NY) 1.5 mM, brilliant yellow (BY) 0.5 mM, marts yellow (MY) 2 mM, coumarin (CM) 1 mM, Sudan III (SIII) 0.5 mM and Sudan IV (SIV) 0.5 mM; eluent A: 50 mM ammonium acetate (pH 5), eluent B: acetonitrile, linear gradient 0–60% B for 5 min, then 100% B for 3 min; flow rate $1 \mu\text{L min}^{-1}$; column: $18 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m}$ i.d.; injection volume: 20 nL; detection: 355 nm LED on-capillary photometric. The arrows show the times when the 4-port valves were switching as discussed in the text. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2

The repeatability of gradient separations. Chromatographic conditions as in Fig. 6 a, for other conditions see Experimental.

Compounds	t_R (min)	RSD ($n = 8$) t_R	Peak area (mAU*s)	RSD ($n = 8$) Peak area
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1.19	1.2%	77	3.2%
Tartrazine	2.86	4.6%	45	5.4%
Orange G	3.45	3.5%	29	6.4%
Naphthol Yellow	3.76	3.5%	23	5.3%
Brilliant Yellow	6.17	1.2%	79	4.2%

pressurised gas reservoir pumps for example), and (iii) the system is truly bio-compatible with no contact with metal parts. A pumping syringe system optimally of 5 μL syringes capable of producing medium pressures up to 11.6 MPa sufficient for rapid analysis when using monolithic or short columns and generating isocratic and gradient elution separations. An automated miniaturised splitless nano-flow pumping system that meets

the requirements of minimum mobile phase consumption with solvent use typically 60 μL per hour.

3. On-site analysis potential: A miniaturised MPLC analysis system can provide a capability to operate on-site or in field analyses.
4. Fluidic design flexibility: The modular flexible design significantly widens the availability of such portable systems for other

applications, with post-column reaction derivatisation or in-line sample treatment under investigation.

5. This low-cost system off-the-shelf approach may also have an excellent educational value especially given the modular, flexible and low-cost design philosophy.

Future developments will focus primarily on (i) achieving higher maximum working pressure values and improving the pump performance, (ii) improving UV-detection sensitivity and LOD values by a z-cell type detector, and hyphenating the UV detection with electrochemical detection, and (iii) providing the here presented miniaturised LC with encasement and battery power to allow true portable operation.

Acknowledgements

MM gratefully acknowledges the Australian Research Council Future Fellowship (FT120100559). NN would like to acknowledge the Endeavour Research Fellowship provided by the Australian Government.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.015>.

References

- [1] M.J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication: the Science of Miniaturization*, CRC Press, 2002.
- [2] D. Figeys, D. Pinto, Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences, *Anal. Chem.* 72 (2000) 330 A–335 A.
- [3] G. McMahon, *Analytical Instrumentation: a Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments*, John Wiley & Sons, 2008.
- [4] D. Mark, S. Haeblerle, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1153–1182.
- [5] P. Kubán, H.T.A. Nguyen, M. Macka, P.R. Haddad, P.C. Hauser, New fully portable instrument for the versatile determination of cations and anions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electroanalysis* 19 (2007) 2059–2065.
- [6] M. Ryvolová, M. Macka, M. Ryvolová, J. Preisler, M. Macka, Portable capillary-based (non-chip) capillary electrophoresis, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 339–353.
- [7] P.A. Smith, Person-portable gas chromatography: Rapid temperature program operation through resistive heating of columns with inherently low thermal mass properties, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 37–45.
- [8] H. Nagashima, T. Kondo, T. Nagoya, T. Ikeda, N. Kurimata, S. Unoke, Y. Seto, Identification of chemical warfare agents from vapor samples using a field-portable capillary gas chromatography/membrane-interfaced electron ionization quadrupole mass spectrometry instrument with Tri-Bed concentrator, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 279–290.
- [9] N. Tanda, Y. Hinokio, J. Washio, N. Takahashi, T. Koseki, Analysis of ketone bodies in exhaled breath and blood of ten healthy Japanese at OGTT using a portable gas chromatograph, *J. Breath. Res.* 8 (2014).
- [10] I. Azzouz, J. Vial, D. Thiebaut, R. Haudebourg, K. Danaie, P. Sassiati, J. Breviere, Review of stationary phases for microelectromechanical systems in gas chromatography: feasibility and separations, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 981–994.
- [11] J.H. Sun, F.Y. Guan, D.F. Cui, X. Chen, L.L. Zhang, J. Chen, An improved photoionization detector with a micro gas chromatography column for portable rapid gas chromatography system, *Sens. Actuators B-Chem.* 188 (2013) 513–518.
- [12] M. Schott, C. Wehrenfennig, T. Gasch, R.A. During, A. Vilcinskis, A portable gas chromatograph with simultaneous detection by mass spectrometry and electroantennography for the highly sensitive in situ measurement of volatiles, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7457–7467.
- [13] N. Reyes-Garcés, G.A. Gomez-Rios, E.A.S. Silva, J. Pawliszyn, Coupling needle trap devices with gas chromatography-ion mobility spectrometry detection as a simple approach for on-site quantitative analysis, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 193–198.
- [14] M.N. Baldin, V.M. Gruzov, A portable gas chromatograph with air carrier gas for the determination of explosive traces, *J. Anal. Chem.* 68 (2013) 1002–1006.
- [15] S. Fanali, P.R. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D.K. Lloyd, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Elsevier, 2013.
- [16] T.L. Chester, Recent developments in high-performance liquid chromatography stationary phases, *Anal. Chem.* 85 (2013) 579–589.
- [17] J. Sestak, F. Dusa, D. Moravcova, V. Kahle, Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations, *J. Chromatogr. A* 1276 (2013) 26–32.
- [18] G.I. Baram, M.A. Grachev, N.I. Komarova, M.P. Perelroyzen, Y.A. Bolvanov, S.V. Kuzmin, V.V. Kargaltsev, E.A. Kuper, E.S.P.B. V. S. Division, Micro-column liquid chromatography with multi-wave-length photometric detection. I. The OB-4 micro-column liquid chromatograph, *J. Chromatogr. A* 264 (1983) 69–90.
- [19] G.I. Baram, Portable liquid chromatograph for mobile laboratories: I. Aims, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 387–399.
- [20] V.M. Tulchinsky, S. Technologies, A.B. Park, A Practical Portable HPLC System — MINICHROM, a New Generation for Field, HPLC 2 (1998) 281–285.
- [21] <http://www.iconsci.com/worldsmallesthplc.html> (accessed 27.01.15).
- [22] C.B. Boring, P.K. Dasgupta, A. Sjögren, Compact, field-portable capillary ion chromatograph, *J. Chromatogr. A* 804 (1998) 45–54.
- [23] O.P. Kalyakina, A.M. Dolgonosov, Ion-chromatographic determination of fluoride ions in atmospheric precipitates and natural waters, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 951–953.
- [24] D. Victory, P. Nesterenko, B. Paull, Low-pressure gradient micro-ion chromatography with ultra-short monolithic anion exchange column, *Analyst* 129 (2004) 700–701.
- [25] L.K. Kiplagat, P. Kubán, P. Pelcová, V. Kubán, V. Kubán, P. Kubán, Portable, lightweight, low power, ion chromatographic system with open tubular capillary columns, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5116–5123.
- [26] M.A. Nelson, A. Gates, M. Dodlinger, D.S. Hage, Development of a portable immunextraction-reversed-phase liquid chromatography system for field studies of herbicide residues, *Anal. Chem.* 76 (2004) 805–813.
- [27] S. Sharma, A. Plitil, R.S. Simpson, K. Liu, P.B. Farnsworth, S.D. Stearns, M.L. Lee, Instrumentation for hand-portable liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1327 (2014) 80–89.
- [28] S. Sharma, H.D. Tolley, P.B. Farnsworth, M.L. Lee, LED-based UV absorption detector with low detection limits for capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2) (2015) 1381–1386.
- [29] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature* 442 (2006) 368–373.
- [30] <http://products.labsmith.com/fluid-control-and-connectors/#.VdJ3Nfmqqko> (accessed 18.08.15).
- [31] M. Macka, P. Andersson, P.R. Haddad, Linearity evaluation in absorbance detection: the use of light-emitting diodes for on-capillary detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 17 (1996) 1898–1905.
- [32] C. Johns, M. Macka, P.R. Haddad, Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis* 25 (2004) 3145–3152.
- [33] http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1312-90015_BinPump-B_USR_EN.pdf (accessed 18.08.15).
- [34] D. Corradini, *Handbook of HPLC*, CRC Press, 2010.
- [35] M. Martin, G. Blu, C. Eon, G. Guiochon, The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate, *J. Chromatogr. A* 112 (1975) 399–414.
- [36] <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990-6025EN.pdf> (accessed 20.02.15).
- [37] M. Kiseleva, V. Pimenova, K. Eller, Optimization of conditions for the HPLC determination of synthetic dyes in food, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 685–690.

11.4 Příspěvek k elektroluminescenčním zdrojům hluboké UV emise pro fotometrickou detekci

Poster oceněný první cenou na mezinárodním mikrofluidickém sympoziu ANZNMFS 2015 v Melbourne. V současné době je připravována publikace do impaktovaného časopisu.



NEW GENERATION DEEP-UV LED FOR PORTABLE ROBUST LOW COST OPTICAL DETECTION IN MICROFLUIDIC AND MINIATURISED ANALYSIS

Miloš Dvořák^{1,2}, Yan Li¹, Nantana Nuchtavorn¹, Pavel N. Nesterenko¹, Mirek Macka¹

¹ Australian Centre for Research on Separation Science (ACROSS), University of Tasmania, Private Bag 75, 7001 Hobart, Australia;
² Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 61200 Brno, Czech Republic
e-mail: mil.dvorak@seznam.cz; Mirek.Macka@utas.edu.au



Motivation

- The applicability of deep-UV-LEDs have been so far limited by their low optical power, parasitic visible light emission, strong heating, commercial availability and high price
- A new generation of deep-UV-LEDs based on AlN (instead of AlGaIn) offer ca 100x improved intensity with radiometric power at mW levels and low visible light parasitic emission

Aims

- Characterization of a new deep-UV-LED for analytical use with focus on:
 - Spectral characteristic and radiometric power
 - Performance in on-capillary detection for microfluidic systems
- To investigate hyphenation of deep UV detection with others detection systems for multiplex detection

Background

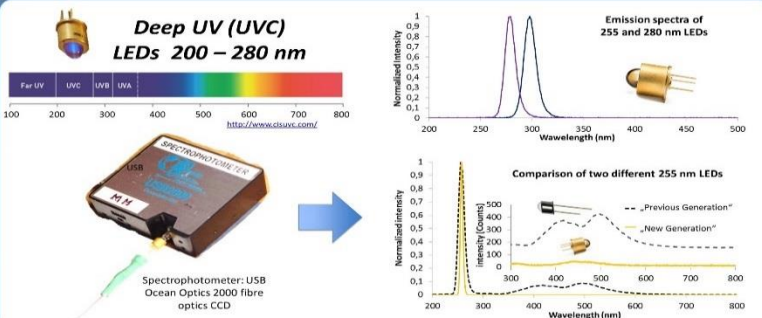
Areas of use of deep UV (UVC) LEDs

- Analysis: Light sources for absorption and fluorescence (portable detection devices, LC & CE, microfluidic systems)
- Sensing, detection and imaging: DNA purity, forensics, security, biosecurity, safety
- Disinfection / sterilisation: Water, air, surfaces etc.
- Purification: Water

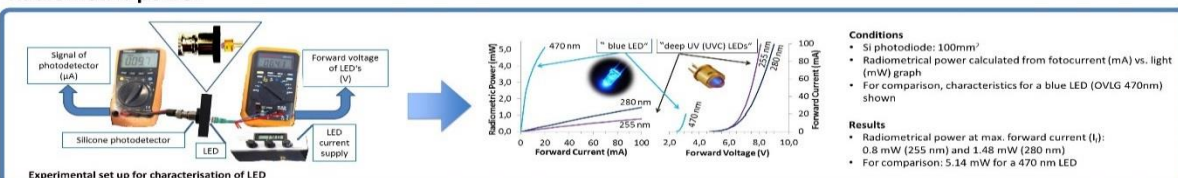
Experimental

Generation	"New"	"Previous"
Parameters	OPTAN255H	UVTOP255-HL
Radiometric power (mW)	0.57	0.014
Lifetime (Hours)	3000	200
Price (AUD \$)	300	700
Emission band width (nm)	11	25
Semiconductor	AlN	AlGaIn

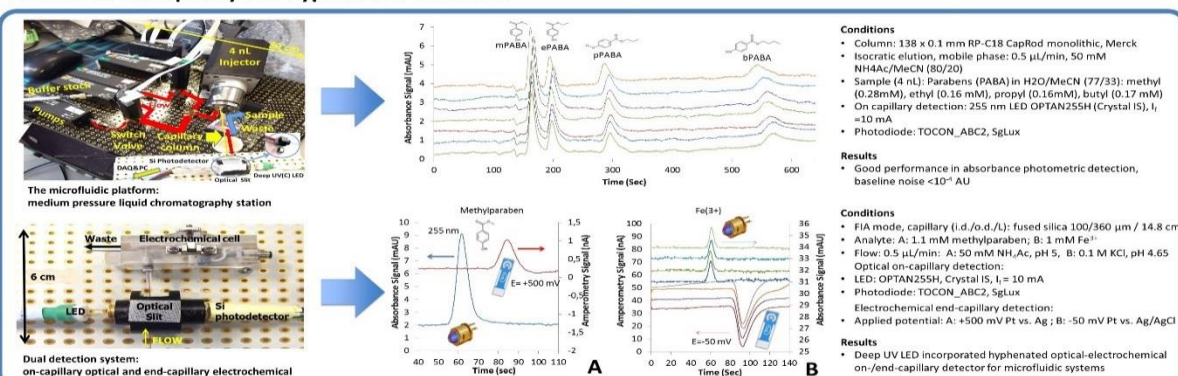
Emission spectra



Radiometric power



Detection: On capillary and hyphenated detection



References

- Johns C., Macka M., Haddad P.R., *Electrophoresis*, 25(18-19), 3145-3152, 2004
- Krcmova L., Sgierlof A., Mehlen S., Hauser P.C., Abele S., Paul B., Macka M., *Analyst*, 2009, vol. 134, 2394-2396,
- Johns C., Macka M., Haddad P.R., King M., Paul B., *J. Chromatogr.*, 2001, A, vol. 927, 237-241.
- Yan L., Dvorak M., Nuchtavorn N., Aufartova J., Krcmova Kujovska L., Nesterenko R.P., Stanley R., Macka M., *Proc. 20th Internat. Symp. on Separation Sciences*, Prague, 2014

Acknowledgements

- ACROSS and School of Physical Science, University of Tasmania
- Australian Research Council (ARC): Future Fellowship Level 3 (Professorial) (FT120100559)